

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Anatomía y Embriología Humana I**



**REORGANIZACIÓN COMATOTÓPICA DE LOS  
MÚSCULOS LARÍNGEOS EN UN MODEL DE  
DEGENERACIÓN EN LA RATA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Ignacio Hernández Morato**

Bajo la dirección de los doctores  
Francisco.José. Valderrama Canales  
Arán. Pascual Font

**Madrid, 2012**

**©Ignacio Hernández Morato, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y  
EMBRIOLOGÍA HUMANA I**



**REORGANIZACIÓN SOMATOTÓPICA  
DE LOS MÚSCULOS LARÍNGEOS  
EN UN MODELO DE  
DEGENERACIÓN-REGENERACIÓN  
EN LA RATA**

**TESIS DOCTORAL**

**Ignacio Hernández Morato**

**Madrid, 2011**

**Directores**

**Dr. F.J. Valderrama Canales**

**Dra. A. Pascual Font**







El Dr. Francisco J. Valderrama Canales, profesor titular de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad Complutense de Madrid y la Dra. Arán Pascual Font

HACEN CONSTAR:

Que la memoria para optar al grado de doctor que presenta a superior juicio del Tribunal D. IGNACIO HERNÁNDEZ MORATO, con el título “REORGANIZACIÓN SOMATOTÓPICA DE LOS MÚSCULOS LARÍNGEOS EN UN MODELO DE DEGENERACIÓN-REGENERACIÓN EN LA RATA”, ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Consideramos que su autor está capacitado para obtener el grado de doctor, siempre y cuando así lo considere el Tribunal designado por la Universidad Complutense de Madrid para juzgar la memoria.

Firmado en Madrid a 21 de noviembre de 2011.

Los directores de la tesis

Francisco J. Valderrama Canales

Arán Pascual Font

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de esta tesis doctoral me ha enseñado que la labor investigadora es un viaje personal en una nave colectiva en la que se van incorporando y desembarcando compañeros que aun de manera no consciente marcan el rumbo personal de cada uno. Sin su ayuda, comentarios, sugerencias y divergencias de las personas que me han rodeado este trabajo sencillamente no hubiera sido posible.

Mi mayor agradecimiento va dirigido hacia mis padres por enseñarnos a mi hermana y a mi que el esfuerzo y la integridad en cualquier actividad es un valor cuya recompensa es duradera a largo plazo.

Deseo agradecer especialmente a Dr. José Ramón Sañudo y Dra. Teresa Vázquez la confianza depositada en mi para desarrollar un trabajo en un campo científico que desconocía, que con el tiempo he aprendido a apreciar y del que espero no distanciarme.

Mi gratitud y cariño más considerado hacía la Dra. Arán Pascual sin cuya colaboración en el laboratorio, dedicación en la interpretación de los resultados y paciencia en la escritura de la tesis, podando mis dispersiones de mente, el resultado de este trabajo hubiera sido muy diferente. Hago extensivo mis agradecimientos hacia el Dr. Francisco Valderrama, cuya tutela en el laboratorio y, sobre todo, en el proceso de pulido de la redacción de este trabajo me ha aportado importantes lecciones para el futuro.

Igualmente me gustaría agradecer al futuro doctor Carlos Ramirez, cuya estrecha colaboración ha resultado beneficiosa para ambos en la fase experimental de nuestros respectivos trabajos, y la Dra. Eva Maranillo por instruirme en el uso correcto del larínscopio y por estar siempre receptiva a cualquier duda que me surgía de la anatomía de la laringe.

También deseo dar las gracias a Marc, Isabel, Jorge, Carmen, Gabi y Gonzalo del lab. IV sin cuya compañía y cooperación, el trabajo en el laboratorio se hubiera vuelto mucho más tedioso y cuyo flujo de opiniones de diferentes direcciones me ayudan constantemente a mantener una perspectiva abierta.

No quisiera dejar en el olvido la participación indirecta de otras personas que también han contribuido en este trabajo. Deseo reconocer la actitud y sincero apoyo de la Dra. Elvira Perona y la Dra. María José Blanco que me animaron a decidirme a tomar este camino vital. También deseo agradecer a los habitantes del pequeño ecosistema que compone la unidad docente de Biología de la Facultad de ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, especialmente a Lars, Samu, Carol, María, Ana, Emma, Celia y Elena. Sin su ayuda y amistad probablemente hubieran frustrado mis primeros pasos en la ciencia.

Asimismo son partícipes de mi agradecimiento los compañeros de carrera y cafetería Juanjo, Emilio, Rosa, Leti, Marta, Noes, y los “mandriles” porque indirectamente con su amistad me han ayudado anímicamente a la concluir esta etapa de este viaje. En momentos como este vosotros también prevalecéis.

Por último, siendo consciente de que algunas personas que lo merezcan quedarán inconscientemente excluidas resumo mi agradecimiento “a los que me quieren porque les quiero”.

## ÍNDICE

Introducción	11
1. Laringe	12
1.1 Cartílagos laríngeos	13
1.2 Articulaciones laríngeas	16
1.3 Membranas y ligamentos laríngeos	16
1.4 Cavidad laríngea	17
1.5 Músculos laríngeos	19
1.6 Vascularización de la laringe	23
2. Inervación de la laringe	23
2.1 Nervio laríngeo superior	24
2.2 Nervio laríngeo recurrente	25
2.3 Inervación autónoma de la laringe	26
2.4 Distribución de los diferentes componentes funcionales en los nervios laríngeos	26
3. Núcleos implicados en la inervación laríngea	28
3.1 Núcleo del tracto solitario	28
3.2 Núcleo dorsal del vago	29
3.3 Núcleo ambiguo	29
4. Representación somatotópica de la musculatura laríngea en el núcleo ambiguo	32
4.1 Modelos animales	32
4.2 Metodología experimental	33
4.3 Localización de las motoneuronas laríngeas en el núcleo ambiguo	34
4.4 Número de neuronas	37
5. Estructura del nervio	39
5.1 Proceso de degeneración en un nervio	42
5.2 Proceso de regeneración en un nervio	46
5.3 Modelos animales de degeneración y regeneración de los nervios	47
6. Modelos de degeneración / regeneración	48
6.1 Sincinesias	48
6.2 Transplantes de laringe	49
6.3 Reinervación laríngea como factor limitante	50

Hipótesis y objetivos	54
1. Justificación	55
2. Hipótesis	55
3. Objetivos	56
Material y métodos	57
1. Modelo animal	58
2. Diseño experimental	58
3. Trazador neuronal: la subunidad B de la toxina colérica	59
4. Técnica quirúrgica para la aplicación del trazador	60
4.1 Grupo control	61
4.2 Grupos experimentales	63
5. Procesamiento del tronco del encéfalo	66
6. Microscopía y observación	67
7. Cuantificación y ubicación de las neuronas trazadas	67
Resultados	70
1. Resultados en los animales del grupo control	71
1.1 Inyecciones de CTb en el músculo cricoaritenideo posterior	71
1.1.1 Localización de las neuronas trazadas	72
1.1.2 Número de neuronas trazadas	73
1.1.3 Morfología de las neuronas trazadas	73
1.2 Inyecciones de CTb en el músculo tiroaritenideo	74
1.2.1 Localización de las neuronas trazadas	74
1.2.2 Número de neuronas trazadas	76
1.2.3 Morfología de las neuronas trazadas	76
1.3 Trazado desde los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo	77
2. Grupos experimentales	78
2.1 Motilidad de los pliegues vocales	79
2.2 Localización de las neuronas trazadas	84
2.3 Número de neuronas trazadas	93
Discusión	101
1. Consideraciones técnicas	102
2. Representación somatotópica de los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo	105

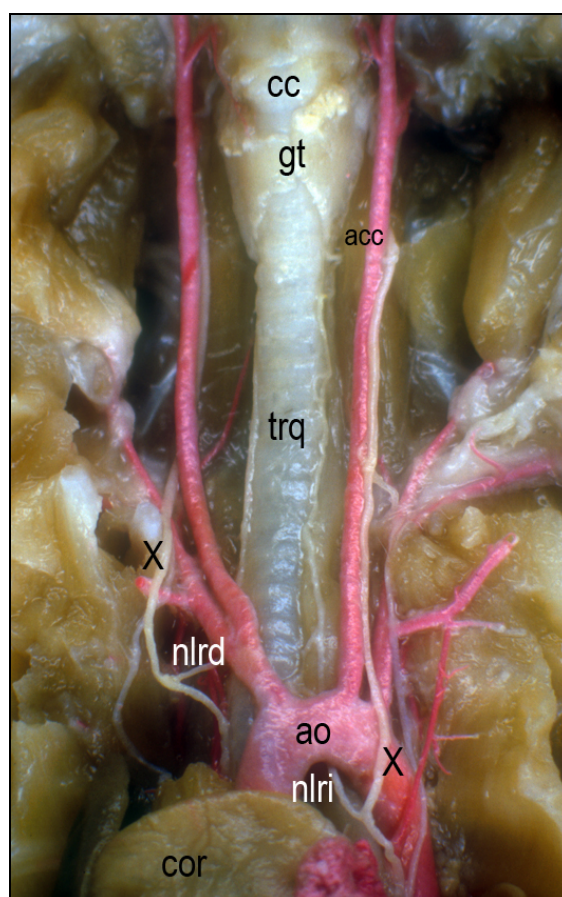


2.1 Distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoso posterior y el músculo tiroaritenoso	105
2.2 Cuantificación de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoso posterior y el músculo tiroaritenoso	110
3. Proceso de reinervación de los músculos cricoaritenoso posterior y tiroaritenoso a lo largo del tiempo	111
3.1 Estado de los pliegues vocales a lo largo del tiempo de supervivencia desde la lesión del nervio laríngeo recurrente	111
3.2 Cambios en la organización somatotópica a lo largo del tiempo supervivencia desde la lesión del nervio laríngeo recurrente	113
3.3 Cambios en el número de neuronas identificadas a lo largo del tiempo de supervivencia desde la lesión del nervio laríngeo recurrente	117
Conclusiones	121
Bibliografía	124

## **INTRODUCCIÓN**

## 1. LA LARINGE

La laringe es un órgano tubular, tapizado internamente por un epitelio mucoso, localizado en la región anterior y media del cuello, craneocaudalmente entre la faringe y la tráquea y, en el hombre adulto, aproximadamente entre la 3ª y la 6ª vértebras cervicales. Está constituida por un conjunto de cartílagos articulados y unidos entre sí por un complejo de ligamentos y membranas. Un grupo de músculos, que constituyen la denominada musculatura laríngea intrínseca, es el encargado de ejecutar los movimientos que permiten a la laringe el cierre y la apertura de la vía aérea (McHanwell, 2008). Una relación anatómica de importancia clínica es la glándula tiroides, que recubre el extremo caudal de la laringe (Cooper, 2009) (figura 1).



**Figura 1.** Disección de una laringe de rata en la que se puede observar el trayecto de los dos nervios laríngeos recurrentes.

**acc.** Arteria carótida común.  
**ao.** Arteria aorta.  
**cc.** Cartílago cricoides.  
**cor.** Corazón  
**gt.** Glándula tiroides.

**nlrd.** Nervio laríngeo recurrente derecho.  
**nlri.** Nervio laríngeo recurrente izquierdo.  
**trq.** Tráquea.  
**X.** Nervio vago.

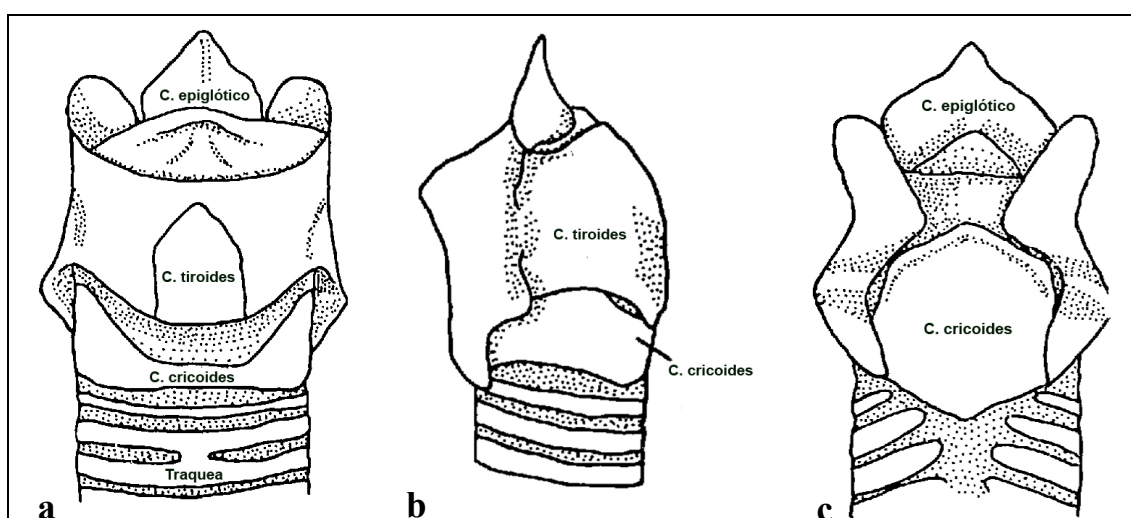
La laringe es un componente intrínseco del sistema respiratorio, cuya función principal es la de permitir que el flujo de aire discurra por las vías respiratorias bajas para que alcance los pulmones. Una segunda función esencial es la de constituir un órgano protector del tracto respiratorio, de tal manera que funciona como un esfínter que favorece el paso de aire e impide, al cerrarse por la acción de los músculos intrínsecos laríngeos, que sustancias extrañas penetren en el tracto respiratorio. Este mecanismo preciso de control de la apertura y cierre de la vía respiratoria permite toda una serie de acciones accesorias pero con relevancia funcional. Así, el estímulo que representa la presencia de partículas extrañas en la mucosa desencadena el reflejo tusígeno que, gracias a la súbita y violenta expulsión de aire, permite expulsar dichas sustancias del tracto respiratorio (Zemlin, 1998). Por otro lado, el cierre de la vía aérea cuando los pulmones están llenos de aire provoca una estabilización de la cintura escapular y de la caja torácica (Fink y Demarest, 1978) que favorece actividades como levantar o desplazar pesos con los miembros superiores, o que requieren grandes presiones intraabdominales como la defecación, la micción o incluso el parto (Zemlin, 1998). Por último, la laringe es el órgano de la fonación. La producción de la voz es una función adquirida secundariamente a la esfinteriana, aunque es de extraordinaria relevancia, ya que el habla, como forma articulada de la voz, es la principal forma de comunicación de los seres humanos. Debido a la extraordinaria capacidad de comunicación de la voz, no resulta extraño que un trastorno que conduzca irreversiblemente a la pérdida de la función fonatoria de la laringe traiga consigo un deterioro psicológico al afectado (Zemlin, 1998).

## **1.1 Cartílagos laríngeos**

En el ser humano, cuatro cartílagos principales conforman la estructura de la laringe (McHanwell, 2008). De ellos, tres son impares, el cricoides, el tiroides y el epiglótico, y el cuarto, el aritenoides, es par. Además de estos cartílagos principales se pueden encontrar tres pares de cartílagos accesorios. Estos cartílagos accesorios se denominan corniculados, cuneiformes y triticeos, y son de menor tamaño que los principales. Entre los elementos esqueléticos de la laringe se extiende un conjunto complejo de membranas y ligamentos.

El *cartílago epiglótico* tiene forma de pétalo o de sillín de bicicleta y su parte más caudal, la más estrecha, está unida a la cara posterior del cartílago tiroides mediante el ligamento

tiroepiglótico. Su parte superior, más redondeada y ancha, se proyecta oblicuamente, hacia atrás y hacia arriba, por detrás de la lengua a la que se une por los ligamentos glosopiglóticos, a la faringe por los ligamentos faringopiglóticos y al hueso hioides mediante el ligamento hioepiglótico. Lateral y posteriormente, un pliegue mucoso da continuidad a los bordes laterales del cartílago epiglótico hasta los cartílagos aritenoides; se trata del pliegue ariepiglótico que contiene en su interior fibras de uno de los músculos intrínsecos. La función de la epiglotis, proyectando hacia atrás y hacia abajo la parte superior durante la deglución, es proteger la laringe de la entrada de líquidos y partículas extrañas (McHanwell, 2008) (figura 2).



**Figura 2.** Imágenes de los cartílagos laríngeos de la rata en las visiones dorsal (a), lateral (b) y ventral (c) (Smith, 1977).

El *cartílago cricoides* tiene forma de anillo de sello. Su borde inferior está unido al primer anillo traqueal por la membrana cricotraqueal. Este cartílago se articula con el cartílago tiroides y con los cartílagos aritenoides. En su parte anterior forma un estrecho arco curvado, denominado arco del cartílago cricoides, que se ensancha hacia su parte posterior. El músculo cricotiroideo se inserta en esta parte anterior y por detrás de él está el sitio de inserción del músculo cricofaríngeo. En su parte posterior el cartílago cricoides da forma a una lámina más ancha, la lámina del cricoides que, en su cara posterior, presenta una cresta media con dos depresiones a ambos lados donde se insertan ambos músculos cricoaritenoides posteriores. En la superficie externa de la unión entre cada rama del arco con la lámina están presentes las facetas de las articulaciones cricotiroideas. En borde superior de la lámina se observan dos superficies articulares para los cartílagos aritenoides (McHanwell, 2008) (figura 2).

El *cartílago tiroides* es el mayor cartílago de los que componen la laringe. Está formado por dos láminas cuadrangulares simétricas fusionadas en la parte anterior. En la parte superior las láminas están separadas por una incisura en forma de V. En la parte posterior, el cartílago tiroides presenta dos astas superiores y dos astas inferiores. En las dos astas superiores se insertan los ligamentos que se unen con el hueso hioides: los ligamentos tirohioideos. La superficie interna del cartílago es lisa y sobre ella se insertan varios ligamentos, como los ligamentos vocales, que se insertan en el ángulo formado entre las dos láminas. El borde inferior del cartílago tiroides se une con el cartílago cricoides por medio del ligamento cricotiroideo que es una porción más densa de la membrana cricotiroidea (McHanwell, 2008; Cooper, 2009) (figura 2).

El par de *cartílagos aritenoides* tienen forma de pirámide triangular de vértice superior. Cada cartílago tiene tres superficies, dos apófisis, una base y un ápex. La superficie posterior, que es cóncava y lisa, está cubierta por el músculo aritenoides transversos. La superficie anterolateral es convexa y rugosa y es el sitio de inserción del ligamento vestibular y los músculos vocal y cricoaritenoides lateral. La superficie anteromedial es estrecha, lisa y plana y forma parte de la hendidura glótica. La base del cartílago es cóncava, con una superficie lisa para la articulación con la parte lateral del borde superior de la lámina del cartílago cricoides. El ángulo lateral de la base proyecta hacia atrás y es la apófisis muscular donde se insertan los músculos cricoaritenoides posterior y cricoaritenoides lateral. El agudo ángulo frontal es la apófisis vocal que es el sitio de inserción del ligamento vocal (McHanwell, 2008).

En la rata, aparte de los cartílagos descritos en el hombre, se describe un cartílago adicional que, debido a su similitud con la forma de un ala delta, recibe el nombre de cartílago alar. Está localizado en la base del cartílago epiglótico, al que se une por tejido conectivo, y permite la inserción de dos músculos laríngeos intrínsecos exclusivos de la rata (Kobler y cols., 1994; Inagi y cols., 1998).

## **1.2 Articulaciones laríngeas**

Las articulaciones principales para la función laríngea se establecen entre el cartílago tiroides y el cartílago cricoides, y entre ambos cartílagos aritenoides y el cartílago cricoides. En ambos casos se trata de articulaciones sinoviales incluidas en sus correspondientes cápsulas con componente fibroso y sinovial.

Las *articulaciones cricotiroideas* se establecen entre las superficies articulares ubicadas en las astas inferiores del cartílago tiroides y las facetas articulares laterales del cartílago cricoides. El eje principal de la articulación es transversal y cruza las articulaciones de ambos lados. Aunque no hay un consenso general, parece probable que, a través de dicho eje transversal, sea el cricoides el que rote sobre el tiroides en un movimiento que lleva el arco cricoideo hacia la lámina tiroidea; de este modo, se provoca un “estiramiento” de los pliegues vocales que añade tensión a los mismos (McHanwell, 2008).

Las *articulaciones cricoaritenoides* implican a las superficies articulares superiores del cricoides y la cara articular de cada uno de los cartílagos aritenoides. La articulación permite dos movimientos; según un eje vertical la rotación del aritenoides sobre el cartílago cricoides, quedando orientada así la apófisis vocal del aritenoides en diversas posiciones desde medial a lateral. El otro movimiento permitido es de deslizamiento lateral-medial de ambos aritenoides, lo que provoca al acercamiento o alejamiento de los cartílagos aritenoides entre si. Ambos movimientos están asociados y como resultado se producen los movimientos de abducción/aducción de hendidura glótica (McHanwell, 2008).

## **1.3 Membranas y ligamentos laríngeos**

Los cartílagos laríngeos están unidos entre si por medio de membranas y ligamentos. Al igual que con los cartílagos, las membranas se clasifican en membranas extrínsecas, como la membrana tirohioidea, e intrínsecas, como la membrana cuadrangular, el cono elástico o la membrana cricotiroidea.

La *membrana tirohioidea* es una membrana ancha y fibroelástica que se extiende desde el borde superior del cartílago tiroides hasta borde inferior del hueso hioides. En su parte media se sitúa el ligamento tirohioideo medio y en sus laterales la membrana es atravesada por el nervio laríngeo superior y por la arteria y vena tirohioideas superiores (McHanwell, 2008).

La *membrana cuadrangular* es una membrana intrínseca que se sitúa entre el borde lateral de la epiglotis y el cartílago aritenoides ipsilateral. El borde superior da forma al ligamento ariepiglótico, que recubierto de mucosa constituye el pliegue ariepiglótico. El borde inferior forma al ligamento vestibular que compone el pliegue vestibular (McHanwell, 2008).

La *membrana cricotiroidea* es una membrana intrínseca que se extiende entre el borde superior del cartílago cricoides y el borde inferior del cartílago tiroides. En su parte medial esta membrana aparece engrosada, constituyendo el ligamento cricotiroideo (McHanwell, 2008).

El *cono elástico*, denominado clásicamente membrana cricovocal, se extiende entre el borde superior del arco del cricoides, la apófisis vocal del aritenoides y la superficie interna del ángulo formado por las dos láminas del tiroides. El borde superior, entre el ángulo tiroideo y la apófisis vocal aritenoidea forma el ligamento vocal (McHanwell, 2008).

## **1.4 Cavity laríngea**

Se extiende desde la entrada de la laringe hasta el borde inferior del cartílago cricoides. Las paredes de la cavidad están compuestas por las membranas fibroelásticas recubiertas por la mucosa que se refleja sobre los bordes libres de las membranas. A cada lado la continuidad de la membrana fibroelástica está aparentemente interrumpida por los pliegues laríngeos vestibulares y vocales, aunque en realidad continúa tapizando el interior de las cavidades denominadas ventrículos laríngeos, pliegues que dividen la cavidad laríngea en tres segmentos:

1. El espacio superior, el vestíbulo laríngeo, está delimitado entre la entrada de la laringe (aditus laryngis) y los pliegues vestibulares (McHanwell, 2008).



2. La parte media de la cavidad laríngea está comprendida entre los pliegues vestibulares y los pliegues vocales. Los pliegues vestibulares están compuestos por el ligamento vestibular, que no es otra cosa que el fino borde inferior de la membrana cuadrangular cubierto de mucosa. Este ligamento se inserta en el cartílago tiroides por debajo del borde inferior del cartílago epiglótico y en la superficie anterolateral del cartílago aritenoides. Entre el pliegue vestibular y el pliegue vocal hay una hendidura que abre a un receso de forma fusiforme denominado ventrículo laríngeo (McHanwell, 2008).

El pliegue vocal es el ligamento vocal, que es el borde superior libre del cono elástico, recubierto de una mucosa de características especiales. El ligamento vocal se extiende desde el ángulo del cartílago tiroides, en la mitad de su altura aproximadamente, y la apófisis vocal del cartílago aritenoides, junto con el músculo vocal, y se rodea de tejido conjuntivo y mucosa, quienes estructuran conjuntamente el pliegue vocal. El aspecto de este pliegue es de color nacarado, a diferencia de los vestibulares que son de color más rosado. Los pliegues vocales son importantes responsables de la apertura y cierre de la vía aérea, y de ellos depende completamente la generación de la voz, producida por la vibración de los mismos por el paso restringido de aire por la luz de la laringe. El espacio entre los bordes libres de los pliegues vocales, anteriormente, y las apófisis vocales de los aritenoides, posteriormente, recibe el nombre de hendidura glótica (McHanwell, 2008).

3. El piso inferior de la cavidad laríngea se denomina cavidad infraglótica y queda comprendido entre los pliegues vocales y el borde inferior del cartílago cricoides. Este espacio es continuo con la luz de la tráquea. Las paredes de esta cavidad están curvas con objeto de que el aire pase a través de la glotis con la menor pérdida de energía (McHanwell, 2008).

La cavidad de la laringe está recubierta por una mucosa compuesta por un epitelio pseudoestratificado columnar ciliado en toda su extensión, a excepción de la región glótica donde el epitelio es de tipo escamoso. La mucosa laríngea se continúa rostralmente en la cavidad faríngea y caudalmente con la tráquea. Embebidas por este tejido epitelial se encuentran células secretoras de mucus con mayor concentración en las inmediaciones de los pliegues vocales, con la función de lubricarlos (Smith, 1977; McHanwell, 2008; Cooper, 2009).

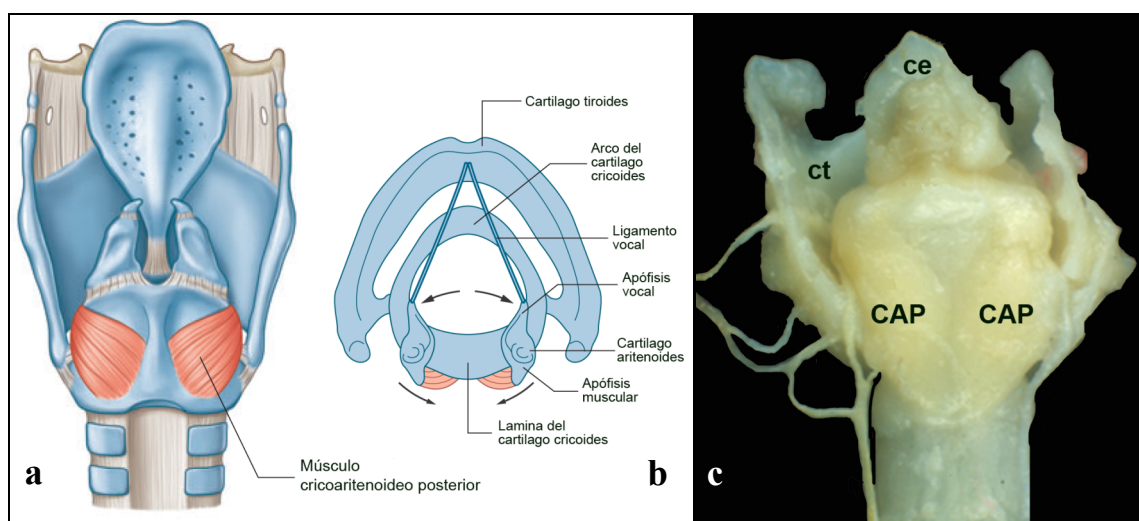
## 1.5 Músculos laríngeos

El conjunto de músculos que actúa sobre la laringe se puede clasificar en dos grupos: músculos extrínsecos y músculos intrínsecos. Los músculos extrínsecos laríngeos se relacionan indirectamente con la laringe, no tienen el origen o la inserción en ella, actuando sobre todo el órgano como estructura única, fundamentalmente mediante desplazamientos verticales del mismo durante la deglución, la fonación y la respiración. Entre los músculos extrínsecos más destacados encontramos los infrahioideos tirohioideo, esternotiroideo y esternohioideo, y los constrictores faríngeos, sobre todo el constrictor inferior de la faringe, con sus fascículos cricofaríngeo y tirofaríngeo. Otros músculos extrínsecos de la laringe son los elevadores de la faringe estilofaríngeo y palatofaríngeo (McHanwell, 2008; Cooper, 2009). Además de éstos, hay otros músculos que modifican la posición de la laringe en el cuello aunque no actúen directamente sobre ella, como es el caso de algunos suprahioideos como el músculo genihióideo que, a través del hioides, eleva y adelanta la laringe durante la deglución (McHanwell, 2008).

Los músculos intrínsecos laríngeos son aquellos que tienen su origen y su inserción en estructuras laríngeas y que, por lo tanto, actúan sobre las diferentes partes de la misma. En el hombre se describen básicamente cinco músculos intrínsecos pares (cricotiroideo, cricoaritenóideo lateral, tiroaritenóideo –incluyendo el vocal y el tiroepiglótico-, cricoaritenóideo posterior y aritenóideo transverso –incluyendo el ariepiglótico-), y un músculo intrínseco impar (aritenóideo transverso) (McHanwell, 2008; Cooper, 2009). Todos estos músculos están inervados por ramas del nervio laríngeo recurrente, menos el cricotiroideo, que lo es por la rama externa del nervio laríngeo superior (Maranillo y cols., 2003b, 2005).

El *músculo cricoaritenóideo posterior* se origina en la cara posterior de la lámina del cricoides. Sus fibras se dirigen hacia arriba y hacia fuera y convergen en la inserción sobre la porción superior y posterior de la apófisis muscular del cartílago aritenoides ipsilateral. Este trayecto de las fibras musculares y el eje vertical de la articulación cricoaritenóidea hacen que sea el único de todos los músculos intrínsecos laríngeos cuya acción abduce los pliegues vocales. Por ello, es también denominado el músculo inspirador, ya que es el único que abre la

hendidura glótica permitiendo el paso del aire a través de la cavidad laríngea (McHanwell, 2008) (figura 3).



**Figura 3.** Imágenes que muestran la localización del músculo cricoaritenideo posterior. Las imágenes **a** (vista posterior) y **b** (vista superior) son representaciones esquemáticas tomadas del Gray's Anatomy (McHanwell, 2008). La imagen **c** es una fotografía de una disección de la laringe de la rata vista dorsalmente y en ella podemos observar ambos músculos cricoaritenoides posteriores (disección de la Dra. Eva Maranillo).

ce. Cartilago epiglótico

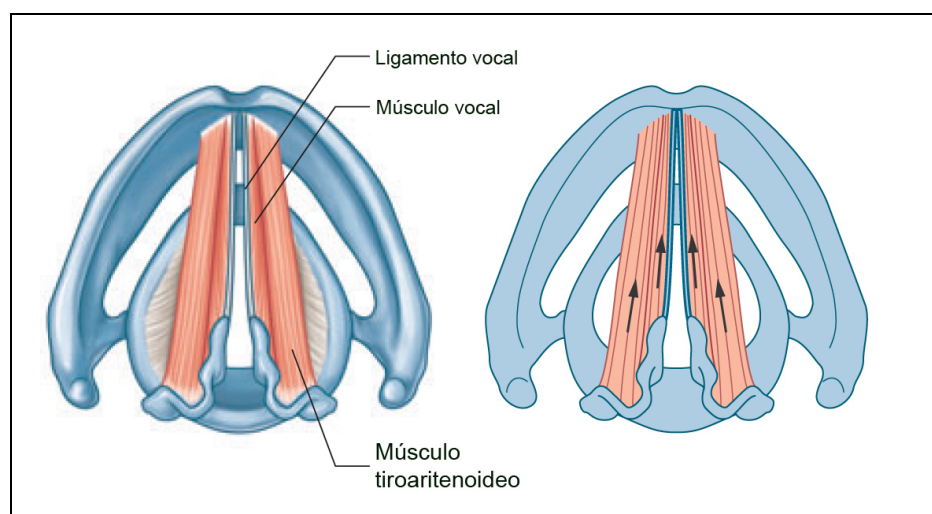
ct. Cartilago tiroides

CAP. Músculo cricoaritenideo posterior

El *músculo cricoaritenideo lateral* se origina en el borde superior de la porción lateral de la lámina del cartílago cricoides. Sus fibras ascienden oblicuamente hacia atrás hasta insertarse en la apófisis muscular del cartílago aritenoides ipsilateral. Su función es cerrar la glotis mediante un movimiento de rotación medial de los cartílagos aritenoides, que aproxima ambas apófisis vocales. Secundariamente, este movimiento ayuda a reducir la tensión sobre el ligamento vocal al verse reducida su longitud (McHanwell, 2008, Cooper, 2009).

El *músculo tiroaritenideo* es un músculo ancho y fino que se inserta ventralmente en el ángulo que forma el cartílago tiroides, junto al ligamento cricotiroideo. Sus fibras discurren en dirección posterior, lateral y superior hasta la superficie anterolateral del cartílago aritenoides. Las fibras inferiores y profundas forman un paquete, de forma triangular en los cortes coronales, que se inserta entre la superficie lateral de la apófisis vocal y la parte inferior de la superficie anterolateral del cartílago aritenoides. Este grupo de fibras se denomina músculo vocal y discurre paralelo y lateral al ligamento vocal. La contracción del músculo tiroaritenideo acerca los cartílagos aritenoides hacia el cartílago tiroides y provoca la rotación medial de los cartílagos aritenoides. Por consiguiente, ayuda al cierre de la vía aérea

junto con la contracción del músculo cricoaritenoso lateral (Sasaki, 2006; McHanwell, 2008). En cambio, la acción del músculo vocal modifica el volumen de los pliegues laríngeos alterando con ello el timbre de la voz (McHanwell, 2008) (figura 4).



**Figura 4.** Representaciones esquemáticas que muestran la localización de los músculos tiroaritenoso y vocal desde una vista superior (McHanwell, 2008).

El *músculo cricotiroides* se inserta caudalmente en la superficie anterior del arco del cartílago cricoides, a ambos lados del ligamento cricotiroides. Sus fibras se dirigen hacia atrás y hacia arriba y divergen en dos grupos: la porción oblicua, casi horizontal, que, ipsilateralmente, se inserta en el asta inferior del cartílago tiroides y la parte posterior del borde inferior de la lámina tiroidea, y la porción recta que asciende más verticalmente hasta la parte anterior del borde inferior de la lámina tiroidea. Su contracción acorta la distancia entre el borde superior de la lámina del cartílago cricoides y el borde anterior del cartílago tiroides, mediante la rotación en la articulación cricotiroides. A la vez, hay un movimiento de deslizamiento cuando el cartílago cricoides empuja al cartílago tiroides hacia adelante. Como consecuencia de estos dos movimientos, la tensión del ligamento vocal se incrementa por un aumento de la distancia entre los cartílagos tiroides y aritenoides (Sasaki, 2006; McHanwell, 2008).

El *músculo aritenoso* es el único músculo no pareado de todos los músculos intrínsecos laríngeos. Comprende dos porciones: transversa y oblicua. La porción transversa se extiende entre las superficies posteriores de ambos cartílagos aritenoides, insertándose en la parte posterior de la apófisis muscular y los bordes laterales del cartílago. La contracción de esta porción conduce a un movimiento de aproximación de los cartílagos aritenoides sobre el

cartílago cricoides. Su acción resulta fundamental durante la deglución, ya que provoca el cierre completo de la hendidura glótica que con la contracción del resto de los músculos aductores no se puede producir completamente (Sasaki, 2006; McHanwell, 2008). La porción oblicua es par y se sitúa posterior a la porción transversa. Sus fibras cruzan oblicuamente de un cartílago aritenoides al otro, y viceversa, desde la parte posterior de la apófisis muscular de unos de los cartílagos hacia el ápex del otro. Algunas fibras continúan lateralmente en continuación con el borde libre de la membrana cuadrangular hasta la epiglotis, dando forma a un pliegue constituido por estas fibras, ahora bajo el nombre de *músculo ariepiglótico*. La contracción de la porción oblicua del músculo aritenoideo y la del músculo ariepiglótico tiene como efecto la aducción de los pliegues ariepiglóticos y el acercamiento de la parte superior del cartílago epiglótico a los cartílagos aritenoides causando un cierre incompleto de la entrada de la laringe. Además, ayuda a la aducción de los pliegues vocales por aproximación de ambos cartílagos aritenoides de manera más efectiva que la acción solitaria de la porción transversa (McHanwell, 2008).

En la rata los músculos cricoaritenoideo posterior, cricoaritenoideo lateral, tiroaritenoideo y cricotiroideo se organizan de igual manera que la descrita para el ser humano. Sin embargo, el músculo tiroaritenoideo aparece dividido por un septo en dos partes: el tiroaritenoideo medial y el tiroaritenoideo lateral (Inagi y cols., 1998). Además, en la rata los músculos aritenoideo y ariepiglótico están ausentes y su función es llevada a cabo por otros dos músculos exclusivos de esta especie y que tienen sus orígenes en el cartílago alar. El músculo mayor se denomina músculo cricoaritenoideo alar. Se extiende desde el cartílago alar y la base de la epiglotis hasta la cara lateral del cartílago aritenoides en un recorrido por encima del músculo tiroaritenoideo. La parte más lateral se inserta en el cartílago cricoides. La acción de este músculo es similar a la que realiza el músculo ariepiglótico en el humano. Otra función es ayudar a mantener abierto el vestíbulo laríngeo, que en la rata es más laxo (Kobler y cols., 1994; Inagi y cols., 1998). El segundo músculo exclusivo de la rata se denomina cricoaritenoideo superior. Se extiende desde la cara lateral del cartílago aritenoides hacia el tubérculo medial del cartílago cricoides, ubicado en su parte posterior. La función de este músculo es similar a la desempeñada por el músculo aritenoideo en el ser humano (Kobler y cols., 1994; Inagi y cols., 1998).

## **1.6 Vascularización de la laringe**

La irrigación de la laringe es llevada a cabo por dos arterias: la arteria tiroidea superior y la arteria tiroidea inferior. La arteria tiroidea superior es una rama de la arteria carótida externa que entra en la laringe acompañando al nervio laríngeo superior. De ella emergen ramas como la arteria laríngeo superior o la arteria cricotiroidea. La arteria tiroidea inferior deriva de la arteria subclavia. De esta arteria emerge la arteria laríngeo inferior que viaja con el nervio laríngeo recurrente hasta su entrada en la laringe. Dentro de la laringe los vasos derivados de una y otra arteria se anastomosan profusamente.

El drenaje venoso corre paralelo a las arterias tiroideas y sus vasos son tributarios de la vena tiroidea superior, que drena en la vena yugular interna, y de la vena tiroidea inferior, que habitualmente drena en la vena braquiocefálica izquierda (McHanwell, 2008; Cooper, 2009).

El drenaje linfático de la región supraglótica acompaña a la arteria laríngeo superior, mientras que el drenaje linfático de la porción subglótica corre paralelo a la arteria laríngeo inferior (McHanwell, 2008).

## **2. INERVACIÓN DE LA LARINGE**

La laringe es inervada por los nervios laríngeos superior y recurrente, que son ramas del nervio vago. Este nervio tiene su origen aparente en el surco dorsolateral de la médula oblongada. Abandona la cavidad craneal por el foramen yugular, donde se localizan dos ganglios de carácter sensitivo (el ganglio superior -o yugular- y el inferior -o nodoso-). Su distribución es compleja y la más extensa de los nervios craneales. En el cuello inerva la faringe, la laringe y el esófago; en el tórax el esófago, la tráquea, los bronquios, la pleura visceral, los pulmones y el corazón; finaliza su distribución en la cavidad abdominal donde inerva las vísceras abdominales hasta la mitad derecha del colon transversal (Wilson-Pauwels y cols., 2003; Borley, 2008; Khan y Zhang, 2008; Uebing y Uemura, 2008). Funcionalmente el nervio vago es un nervio mixto responsable de la transmisión de la información motora, sensitiva y autónoma implicada en el control respiratorio, cardíaco y digestivo (Wilson-Pauwels y cols., 2003; Borley, 2008; Khan y Zhang, 2008; Uebing y Uemura, 2008).

## **2.1 Nervio laríngeo superior**

El nervio laríngeo superior es el mayor de los ramos del vago en el cuello y emerge de la superficie medial del ganglio vagal inferior. Recibe un ramo comunicante simpático desde el ganglio cervical superior y desciende a lo largo de la faringe, en relación con la arteria carótida interna. Finalmente, se divide en los nervios laríngeo interno y externo (Khan y Zhang, 2008; McHanwell, 2008).

El nervio laríngeo interno es sensitivo para la mucosa infraglotica y también porta fibras aferentes desde los husos neuromusculares laríngeos y otros receptores de estiramiento (Khan y Zhang, 2008). Desciende hasta la membrana tirohioidea, la perfora, habitualmente por encima de la arteria laríngea superior, y se divide en las ramas superior, media e inferior (McHanwell, 2008). La rama superior suministra inervación a la mucosa de la faringe, la epiglotis, la vallécula glosopiglótica, la fosa piriforme y el vestíbulo laríngeo (Khan y Zhang, 2008; McHanwell, 2008). La rama media, la más grande, se distribuye por la mucosa del vestíbulo laríngeo, concretamente por la correspondiente a la membrana cuadrangular, llevando probablemente las aferencias correspondientes al reflejo tusígeno (McHanwell, 2008). Finalmente, la rama inferior se distribuye por la mucosa del ventrículo laríngeo y el espacio subglótico (Khan y Zhang, 2008; McHanwell, 2008). En la pared medial de la fosa piriforme, ramos descendentes del nervio laríngeo interno dan pequeños filetes que alcanzan el músculo aritenioideo transverso y un número de ramos comunicantes con ramos ascendentes del nervio laríngeo recurrente (McHanwell, 2008).

El nervio laríngeo externo continua en sentido inferior y anterior sobre el músculo constrictor inferior de la faringe, al que envía algunas ramas (McHanwell, 2008). Pasa bajo la inserción del músculo esternotiroideo en la línea oblicua del cartílago tiroides y suministra fibras para el músculo cricotiroideo. Un nervio comunicante continua desde la superficie posterior del cricotiroideo, cruza la fosa piriforme y entra en el músculo tiroaritenioideo, donde se comunica con ramos del nervio laríngeo recurrente (McHanwell, 2008). Se ha mostrado que ese ramo comunicante puede proveer fibras tanto motoras al músculo tiroaritenioideo como sensitivas a la infraglotis en humanos (Sañudo y cols., 1999; Maranillo y

cols., 2003b), y en el gato se ha demostrado electrofisiológicamente que son fibras aferentes (Suzuki y Kirchner, 1968).

En la rata, además de las ramas externa e interna, del nervio laríngeo superior emerge una tercera rama que inerva un músculo equivalente al constrictor inferior de la faringe humano, el cricofaríngeo, y el músculo tirofaríngeo (Bieger y Hopkins, 1987; Kobler y cols., 1994; Furusawa y cols., 1996).

## **2.2 Nervio laríngeo recurrente**

El nervio laríngeo recurrente difiere, en su origen y curso, en ambos lados. En el lado derecho emerge del vago, en posición anterior a la primera parte de la arteria subclavia, se curva, por debajo y detrás de ella, y asciende por el surco traqueoesofágico; en el lado izquierdo se desprende del vago en el lado izquierdo del cayado aórtico y, justo lateralmente al ligamento arterioso, rodea el arco por debajo y hacia posterior y asciende también por el surco traqueoesofágico (Khan y Zhang, 2008) (figura 1). La parte más craneal del nervio, que tiene una relación importante y variable con la arteria tiroidea inferior, termina alcanzando la laringe pasando el músculo cricofaríngeo, bien a través de sus fibras o profundamente a ellas, cerca de su inserción en la superficie lateral del cartílago cricoides (Maranillo y cols., 2005; McHanwell, 2008). En este punto, el nervio está en relación íntima con la superficie posteromedial de la glándula tiroides, lo que resulta un hecho de gran trascendencia quirúrgica. El tronco principal del nervio se divide en dos ramos, o más, denominándose uno anterior, principalmente motor, y otro posterior, principalmente sensitivo. El ramo anterior inerva primero al músculo cricoaritenoides posterior, con una o más ramas, y luego al aritenoides transversos y al cricoaritenoides lateral antes de terminar en el músculo tiroaritenoides (Maranillo y cols., 2003a, 2005; McHanwell, 2008).

El nervio laríngeo recurrente establece varias y variadas comunicaciones con ramas del nervio laríngeo superior. Así, además del asa de Galeno, conexión directa entre el recurrente y el laríngeo interno, el ramo posterior del recurrente se une al ramo descendente del laríngeo interno y, adicionalmente, hay comunicaciones complejas entre ambos nervios en relación con



los músculos aritenoides y, menos frecuentemente, sobre la lámina del cricoides y el músculo tiroaritenoides (Sañudo y cols., 1999; Marañillo y cols., 2003b; McHanwell, 2008).

En la rata, las comunicaciones entre los nervios laríngicos no han sido estudiadas con tanta profundidad, aunque sí que se han descrito conexiones entre el nervio laríngeo superior y el recurrente (Bieger y Hopkins, 1987; Kobler y cols., 1994). Además, a pesar de que está establecido que el nervio laríngeo recurrente inerva toda la musculatura intrínseca laríngea, a excepción del músculo cricotiroides, se ha descrito que algunas fibras nerviosas del nervio laríngeo recurrente pueden hacer sinapsis en el músculo cricotiroides. Así mismo ocurre con el nervio laríngeo superior que, además de inervar el músculo cricotiroides, algunas de sus fibras pueden alcanzar los músculos tiroaritenoides y cricoaritenoides lateral (Kobler y cols., 1994).

### **2.3 Inervación autónoma de la laringe**

Las fibras parasimpáticas dirigidas a las glándulas mucosas distribuidas por todo el epitelio laríngeo, se distribuyen en el nervio laríngeo superior y el nervio laríngeo recurrente (McHanwell, 2008). La inervación simpática, que está originada en las neuronas postganglionares de los ganglios cervicales superior y medio, se distribuye por la laringe a través del plexo simpático que acompaña a las ramas arteriales laríngicas (McHanwell, 2008).

### **2.4 Distribución de los diferentes componentes funcionales en los nervios laríngicos.**

Las fibras *aferentes viscerales generales* (AVG) conducen la información aferente del sistema respiratorio, cardiovascular y tracto gastrointestinal. En la laringe hay quimiorreceptores y mecanorreceptores que captan información desde los pliegues vocales y la mucosa de la epiglotis. Se ha considerado clásicamente que la información de los receptores localizados en la región supraglótica es conducida por el nervio laríngeo superior mientras que la información infraglótica es vehiculizada por el nervio laríngeo recurrente (Wilson-Pauwels y cols., 2003; Sasaki, 2006; McHanwell, 2008; Cooper, 2009). Sin embargo, existen varios trabajos que contradicen esta interpretación y defienden que únicamente el nervio laríngeo

superior transmite la información sensitiva visceral (Wyke y Kirchner, 1976; Pascual-Font y cols., 2006ab; Pascual-Font y cols., 2011). El cuerpo de estas neuronas se encuentra localizado en el ganglio inferior del vago (Altschuler y cols., 1989) y sus neuronas proyectan hacia la región caudal del núcleo solitario (Hamilton y Norgren, 1984; Sasaki, 2006).

La sensibilidad del sentido del gusto es cursada por las fibras *aferentes viscerales especiales* (AVE). Las papilas gustativas se localizan en la mucosa de la epiglotis, aritenoides y región glótica posterior. La transmisión de la información gustativa es transmitida por las fibras nerviosas canalizadas por el nervio laríngeo superior hasta el núcleo solitario (Wyke y Kirchner, 1976; Hamilton y Norgren, 1984; Wilson-Pauwels y cols., 2003; McHanwell, 2008; Cooper, 2009). Los cuerpos celulares de las neuronas que originan las fibras AVG se sitúan en el ganglio inferior (Altschuler y cols., 1989).

La información exteroceptiva desde la laringe y la faringe corresponde al componente *aferente somático general* (ASG). Al igual que con la información AVG, se ha considerado que la sensibilidad por encima de los pliegues vocales es transportada por fibras del nervio laríngeo superior, mientras que la información de los receptores sensitivos por debajo de la glotis es canalizada por el nervio laríngeo recurrente (Wilson-Pauwels y cols., 2003; Sasaki, 2006; McHanwell, 2008; Cooper, 2009). Sin embargo, en diversos trabajos neuroanatómicos los resultados apuntan a que toda la ASG es conducida por el nervio laríngeo superior (Ranson y cols., 1995; Pascual-Font y cols., 2006ab, 2011), y, desde el punto de vista neurofisiológico, al menos parcialmente (Suzuki y Kirchner, 1969). Los cuerpos neuronales de estas fibras sensitivas están situados en el ganglio inferior y de ahí proyectan sus fibras hasta el núcleo espinal del nervio trigémino en los segmentos rostrales de la médula espinal y caudales de la médula oblongada (Altschuller y cols., 1989; Wilson-Pauwels y cols., 2003). Por otra parte, la información procedente de los mecanorreceptores de las articulaciones laríngeas es canalizada por el nervio laríngeo recurrente (McHanwell, 2008). Las prolongaciones centrales de estos cuerpos neuronales penetran en la médula oblongada y descienden por el tracto espinal del trigémino hasta hacer sinapsis en las neuronas del núcleo espinal del nervio trigémino (Wilson-Pauwels y cols., 2003). En cuanto a los husos neuromusculares, han sido identificados en el humano, aunque no han sido descritos en la rata (Wyke y Kirchner, 1976).

La información *eferente visceral general* (EVG) del nervio vago comprende fibras preganglionares parasimpáticas cuyo origen real se encuentra en el núcleo dorsal del vago (Bieger y Hopkins, 1987; Wilson-Pauwels y cols., 2003). En la faringe y la laringe las fibras parasimpáticas inervan las glándulas situadas en la mucosa (Wilson-Pauwels y cols., 2003). Se admite que las fibras que inervan la región supraglótica se encuentran en el nervio laríngeo superior y las que inervan la región infraglótica se encuentran en el nervio laríngeo recurrente (Wilson-Pauwels y cols., 2003; Sasaki, 2006; McHanwell, 2008; Cooper, 2009), aunque en otros trabajos no hay pruebas de que el nervio laríngeo recurrente contenga fibras autónomas eferentes (Pascual-Font y cols., 2006ab; Pascual-Font y cols., 2011).

El componente *eferente visceral especial* (EVE) es el componente motor que inerva la musculatura esquelética derivada de los arcos faríngeos durante el desarrollo embrionario. Las fibras EVE que inervan la faringe y la laringe tienen sus cuerpos neuronales en el núcleo ambiguo (Bieger y Hopkins, 1987). Las fibras que inervan el músculo cricotiroides se encuentran en el nervio laríngeo superior y las fibras que inervan el resto de la musculatura laríngea son vehiculizadas por el nervio laríngeo recurrente (Maranillo y cols., 2003ab, 2005; Wilson-Pauwels y cols., 2003; McHanwell, 2008; Cooper, 2009).

### **3. NÚCLEOS IMPLICADOS EN LA INERVACIÓN LARÍNGEA**

#### **3.1 Núcleo del tracto solitario**

Se extiende desde la decusación piramidal hasta el nivel del polo caudal del núcleo facial (Taber, 1961; Kalia y Sullivan, 1982; Hamilton y Norgren, 1984). Este núcleo es responsable de la sensibilidad gustativa. La información procedente de los dos tercios anteriores de la lengua es canalizada por el nervio facial, mientras que la información procedente del resto de la cavidad oral es canalizada por los nervios glossofaríngeo y vago (Kalia y Mesulam, 1980a; Hamilton y Norgren, 1984). También recibe información sensitiva de los sistemas digestivo, pulmonar y cardiovascular (Lee, 2008). Además, desde este núcleo se proyectan fibras hacia las neuronas autónomas situadas en la médula oblongada y médula espinal (Saper, 2000). En cuanto a la laringe, el núcleo del tracto solitario es receptor de la mayoría de información sensitiva (Kalia y Mesulam, 1980ab; Hamilton y Norgren, 1984; Wilson-Pauwels y cols.,

2003). Dentro de la médula oblongada se localiza en posición dorsomedial, a 1,5 mm sobre el óbex, atravesando el núcleo espinal del nervio trigémino hasta alcanzar el núcleo del tracto solitario. Las fibras hacen sinapsis a lo largo del tracto solitario ipsilateral. En niveles caudales al óbex algunas de las fibras que han descendido cruzan por la línea media y alcanzan el núcleo del tracto solitario contralateral (Kalia y Sullivan, 1982; Hamilton y Norgren, 1984).

### **3.2 Núcleo dorsal del vago**

Está situado en posición dorsal en el tronco del encéfalo y se extiende caudalmente desde el primer segmento de la médula cervical hasta el trigono vagal en el suelo del cuarto ventrículo de la médula oblongada. Las neuronas de este núcleo tienen gran variedad de formas (Ramón y Cajal, 1909), aunque mayoritariamente son de morfología fusiforme (Patrickson y cols., 1991; Pascual-Font y cols., 2006b, 2011). Desde el punto de vista funcional las neuronas contenidas en este núcleo son neuronas preganglionares parasimpáticas que inervan no solo la laringe, también otros órganos inervados por el nervio vago como las vísceras del tórax y el abdomen (Kalia y Mesulam, 1980b; Saper, 2000; Lee, 2008).

Las fibras nerviosas procedentes de este núcleo forman un haz que toma dirección ventrolateral. En su camino atraviesan la formación reticular y es en esta región cuando se van incorporando fibras nerviosas procedentes del núcleo ambiguo para emerger por las raicillas del nervio vago (Kalia y Mesulam, 1980b).

### **3.3 Núcleo ambiguo**

El núcleo ambiguo es una columna de células embebida dentro de la formación reticular en la médula oblongada. La columna de neuronas que constituye el núcleo ambiguo está localizada en posición ventrolateral, caudalmente al núcleo motor del nervio facial (Bieger y Hopkins, 1987; Saper, 2000; Lee, 2008). Descrito desde mediados del siglo XIX, fue Krause (1876) quien le dio su nombre actual, debido a lo “indefinido” de su estructura, al hallarse sus neuronas entremezcladas con las de la formación reticular, aunque negó que las células del núcleo ambiguo estuvieran conectadas con el nervio vago. Sin embargo, poco después quedó

definitivamente establecido que el núcleo ambiguo era el núcleo motor ventral del nervio vago (van Gehuchten, 1898; Bunzl-Federn, 1899; Molhant, 1912; Ramón y Cajal, 1909). Aunque ya fue descrito que las fibras nerviosas desde el núcleo ambiguo podían ser conducidas por el nervio glossofaríngeo además de por el nervio vago (Ramón y Cajal, 1909), no fue hasta que se publicaron los trabajos de Lawn (1966ab) en el conejo que se aceptó que las neuronas motoras del nervio glossofaríngeo se encuentran también en el núcleo ambiguo. De este modo, el núcleo ambiguo se define como el origen del componente funcional EVE relacionado con la respiración, la deglución y la fonación. Además de este componente, diversos autores han descrito neuronas preganglionares parasimpáticas (Marinesco y Parhon, 1907), que inervan el corazón desde una subdivisión ventrolateral del núcleo ambiguo (Kosaka, 1909; Nosaka y cols., 1979; Bieger y Hopkins, 1987).

Las neuronas que constituyen el núcleo ambiguo no están distribuidas uniformemente y se han realizado numerosos intentos de describir la citoarquitectura de este núcleo (Lawn, 1966ab; Kalia y Mesulam, 1980ab; Kitamura y cols., 1987; Bieger y Hopkins, 1987; Hopkins, 1995; Saxon y cols., 1996). A finales de la década de 1980, Bieger y Hopkins (1987) describen la organización del núcleo ambiguo que actualmente es la más reconocida (Saper, 2000) y la que nosotros tomaremos como patrón para nuestro estudio. Así, según la descripción de Bieger y Hopkins (1987), topográficamente el núcleo ambiguo está constituido por dos divisiones principales:

**A) División ventral.** También denominada “formación externa”, un conjunto de neuronas eferentes preganglionares parasimpáticas cardíacas localizadas a lo largo de la columna del ambiguo, en posición ventral y lateral a la que será considerada la formación principal, la “división dorsal”.

**B) División dorsal.** Se corresponde con lo que podríamos definir como el núcleo ambiguo de las descripciones clásicas. Está constituida por las neuronas eferentes que inervan los músculos estriados de la laringe, la faringe y el esófago. A su vez, se pueden definir en ella tres subdivisiones en el eje rostrocaudal:

**1. Formación compacta:** Es la más rostral, ubicada inmediatamente caudal al núcleo motor del facial, de donde viene el nombre que inadecuadamente se le ha asignado a veces de “núcleo retrofacial” (Taber, 1961; Lawn, 1966ab; Gacek, 1975; Kalia y Mesulam 1980b; Kalia y Sullivan, 1982; Yoshida y cols., 1982). Recibe el nombre de formación compacta por la densidad con la que están agrupadas las neuronas que la forman, neuronas que proyectan a todos los niveles del esófago, sin guardar una distribución somatotópica, por lo que es el considerado como componente esófagomotor del núcleo ambiguo.

**2. Formación semicompacta:** Ubicada en la posición intermedia de toda la columna del ambiguo, continua caudalmente a la formación compacta. Su nombre proviene de la menor densidad en el agrupamiento de sus neuronas, que proyectan a los músculos de la faringe más el músculo cricotiroideo de la laringe, de ahí que se considera el componente faringomotor del núcleo ambiguo.

**3. Formación laxa:** Es la subdivisión más caudal y sus neuronas se entremezclan de manera poco densa con la formación reticular circundante, de ahí su nombre. Las neuronas de la formación laxa inervan la musculatura intrínseca laríngea, salvo el músculo cricotiroideo, por lo que es considerada el componente laringomotor del núcleo ambiguo.

El trayecto que toman los axones desde el núcleo ambiguo hasta su salida del tronco del encéfalo ha sido descrito en varios trabajos (Ramón y Cajal, 1909; Kalia y Mesulam, 1980b; Lobera y cols, 1981; Pásaro y cols., 1981, 1983; Bieger y Hopkins, 1987). Desde los cuerpos neuronales, los axones se dirigen dorsomedialmente hacia el núcleo dorsal del vago. Próximas a este núcleo, las proyecciones giran bruscamente en dirección ventrolateral hasta su emergencia del tronco del encéfalo.

## **4. REPRESENTACIÓN SOMATOTÓPICA DE LA MUSCULATURA LARÍNGEA EN EL NÚCLEO AMBIGUO**

Los esfuerzos por determinar la localización de las motoneuronas que inervan los músculos intrínsecos laríngeos llevaban acometiéndose recurrentemente desde principios de los años 40 del pasado siglo (Szentàgothai, 1943). Sin embargo, en todo este periodo los resultados presentados por los diferentes autores no son uniformes. Las razones que podrían explicar la disparidad en los resultados alcanzados se pueden resumir en que los ensayos se han realizado sobre diferentes animales de experimentación, y con metodologías dispares para la identificación de las motoneuronas.

### **4.1 Modelos animales**

La determinación de la organización de las motoneuronas que inervan los músculos intrínsecos de la laringe se ha realizado en diversas especies animales. En la lista podemos encontrar el perro (Szentàgothai, 1943; Hisa y cols., 1982, 1984ab; Wallach y cols., 1983; Hisa y Sato, 1987), el conejo (Lawn, 1966ab; Davis y Nail, 1984; Kitamura y cols., 1985, 1987; Okubo y cols., 1987), el gato (Gacek, 1975; Kalia y Mesulam, 1980b; Lobera y cols., 1981; Yoshida y cols., 1982, 1998; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Portillo y Pásaro, 1988b), diversas especies de monos (Yoshida y cols., 1984, 1985, 1987; Vanderhorst y cols., 2001), el cobaya (Basterra y cols., 1987; Nahm y cols., 1990) o el murciélago (Schwizer y cols., 1981). Por supuesto, tal y como sucede en nuestro estudio, la rata ha sido el modelo animal empleado por numerosos autores (Wetzel y cols., 1980; Hinrichsen y Ryan, 1981, 1982; Lobera y cols., 1981; Pásaro y cols., 1981; Kalia y Sullivan, 1982; Yayima y cols., 1982, 1983; Bieger y Hopkins, 1987; Portillo y Pásaro, 1988ab; Flint y cols., 1991; Patrickson y cols., 1991; Núñez-Abades y cols., 1992; Kobler y cols., 1994; Furusawa y cols., 1996; Berkowitz y cols., 1999; Hayakawa y cols., 1999; Waldbaum y cols., 2001; Pascual-Font y cols., 2006ab, 2011; Hirasugi y cols., 2007; Hydman y Mattson, 2008; van Daele y Cassell, 2009).

## **4.2 Metodología experimental**

Los métodos para la determinación de la representación somatotópica de la musculatura intrínseca laríngea en el núcleo ambiguo han sido diversos. El estudio pionero de Szentàgothai (1943) utilizó lesiones eléctricas aplicadas estereotáxicamente al tronco del encéfalo en los territorios correspondientes al núcleo ambiguo para, posteriormente, identificar en qué músculos intrínsecos de la laringe se había producido la degeneración de las placas motoras y correlacionar la posición de la lesión en el tronco del encéfalo con el conjunto de neuronas que inervaban al músculo denervado. También la técnica clásica de la sección nerviosa y observación de las modificaciones neuronales debidas a los cambios producidos por la degeneración walleriana se ha utilizado con el mismo fin. Así, se realizó la sección de los nervios vago y glossofaríngeo para identificar las neuronas que presentaban reacción cromatolítica como respuesta a la sección nerviosa y, de este modo, identificarlas en secciones teñidas con el método de Nissl (Lawn, 1966ab).

Desde mediados de los años 70 se inició el uso de trazadores neuronales para identificar las neuronas implicadas en la inervación de los músculos laríngeos. De este modo, se obtuvo el primer mapa del núcleo ambiguo con el empleo de la peroxidasa de rábano picante -HRP, por sus siglas en inglés- (Gacek, 1975). Sucesivamente, con la rápida expansión del uso de los trazadores en los años 80, se ha ido empleando esta técnica con diversas sustancias más allá de la HRP, trazando tanto desde los nervios como desde los músculos intrínsecos laríngeos, y en diversas especies animales (Kalia y Mesulam, 1980ab; Lobera y cols., 1981; Pásaro y cols., 1981, 1983; Schwizer y cols., 1981; Hisa y cols., 1982, 1984ab; Kalia y Sullivan, 1982; Yoshida y cols., 1982, 1984, 1985, 1987, 1998; Wallach y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Kitamura y cols., 1985, 1987; Basterra y cols., 1987; Bieger y Hopkins, 1987; Hisa y Sato, 1987; Okubo y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988ab; Nahm y cols., 1990; Flint y cols., 1991; Patrickson y cols., 1991; Núñez-Abades y cols., 1992; Kobler y cols., 1994; Hopkins, 1995; Furusawa y cols., 1996; Saxon y cols., 1996; Berkowitz y cols., 1999; Hayakawa y cols., 1999; Vanderhorst y cols., 2001; Waldbaum y cols., 2001; Pascual-Font y cols., 2006ab; 2011; Hirasugi y cols., 2007; Hydman y Mattson, 2008; van Daele y Cassell, 2009).



### **4.3 Localización de las motoneuronas laríngeas en el núcleo ambiguo**

Por la dificultad en el estudio de la laringe, la determinación de la posición de las motoneuronas laríngeas muestra resultados contradictorios en los trabajos publicados al efecto.

En animales diferentes a la rata, la mayoría de los autores están de acuerdo en que las motoneuronas que inervan el músculo cricotiroideo están localizadas en un único grupo y en la posición más rostral con respecto al resto (Szentágothai, 1943; Lawn, 1966a; Hisa y cols., 1982, 1984a; Yoshida y cols., 1982, 1984, 1985, 1998; Davis y Nail, 1984; Okubo y cols., 1987), aunque algún autor ha descrito que en el gato recién nacido estas motoneuronas se localizan en dos grupos independientes (Gacek, 1975). El resto de las neuronas que inervan los músculos intrínsecos laríngeos están localizadas en posición caudal con respecto a las del músculo cricotiroideo. La mayoría de los trabajos establecen una organización rostrocaudal donde las neuronas que inervan el músculo cricoaritenideo posterior están situadas en posición rostral, a continuación de las del cricotiroideo, seguidas caudalmente por las neuronas de los músculos tiroaritenideo, cricoaritenideo lateral y aritenideo. Entre estas poblaciones se observarían áreas de solapamiento (Szentágothai, 1943; Yoshida y cols., 1982, 1985, 1998; Hisa y cols., 1984a; Okubo y cols., 1987). Otros autores, en cambio, establecen que en el gato las poblaciones de motoneuronas aparecen entremezcladas a lo largo de la columna del núcleo ambiguo (Gacek, 1975; Pásaro y cols., 1983). Por último, además de los estudios de distribución en el eje rostrocaudal, algunos estudios han tratado de discriminar la localización de las motoneuronas en el eje dorsoventral, con diferentes resultados para el gato (Gacek, 1975; Yoshida y cols., 1982, 1998) y para el mono (Yoshida y cols., 1985, 1987) (tabla 1).

AUTOR	ANIMAL	TÉCNICA	REPRESENTACIÓN LARÍNGEA
Szentágothai, 1943	Perro	Electroestimulación	En el NA rostral al óbex. Representación rostral a caudal: CT, CAP, TA, CAL, A.
Lawn, 1966ab	Conejo	Degeneración walleriana	En NA. CT en rostral. Resto de la musculatura caudal en formación difusa.
Gacek, 1975	Gato recién nacido	Inyecciones de HRP	NRF y NA separados. En NRF CT y CAP. En NA CAP en formación ventral, resto en formación dorsal.
Yoshida y cols., 1982	Gato	Inyecciones de HRP	En el NA en una única columna rostrocaudal. CT rostral, seguido de CAP, CAL y TA. Región de solapamiento entre CAP, TA, CAL y A.
Pásaro y cols., 1983	Gato	Inyecciones de HRP	En el NA. CT rostral. CAP inmediatamente caudal al CT hasta óbex. TA/CAL caudal al CT hasta inicio CAP
Hisa y cols., 1984a	Perro	Inyecciones de trazadores fluorescentes	En el NA exclusivamente. CT en posición rostral. En posición caudal y separado CAP. Sucesivamente TA, CAL y A. Región de solapamiento entre CAP, TA, CAL y A.
Yoshida y cols., 1985	Mono ( <i>Macaca fustaca</i> )	Inyecciones de HRP	En el NA. Columna continúa. CT rostral. A continuación y en una pequeña área de solapamiento CAP. TA, CAL y A se van disponiendo de manera escalonada ligeramente caudales. Solapamiento rostrocaudal, regionalización en plano transversal.
Okubo y cols., 1987	Conejo	Inyecciones de NY	En el NA. Columna discontinua. CT rostral en columna rostral. En columna central resto de los músculos. CAP y TA solapado, CAL caudal

**Tabla 1.** Diversos estudios sobre la somatotopía de los músculos laríngeos realizados en especies diferentes a la rata.

A. Músculo aritenoides. CAP. Músculo cricoaritenoides posterior. CT. Músculo cricotiroideo. CAL. Músculo cricoaritenoides lateral. TA. Músculo tiroaritenoides. NA. Núcleo ambiguo. NRF. Núcleo retrofacial. HRP. Peroxidasa de rábano picante. NY. Nuclear Yellow

En la rata, análogamente al resto de las especies estudiadas, la mayoría de los autores están de acuerdo en que las neuronas que inervan el músculo cricotiroideo están localizadas en posición rostral con respecto a las neuronas que inervan el resto de la musculatura laríngea (Hinrichsen y Ryan, 1981; Bieger y Hopkins, 1987; Portillo y Pásaro, 1988a; Núñez-Abades y cols., 1992; Furusawa y cols., 1996). La mayoría de los trabajos defienden que el resto de las neuronas que inervan la musculatura intrínseca laríngea están situadas a continuación y que,

por lo tanto, las motoneuronas que proyectan hacia la laringe constituyen una única columna rostrocaudal (Hinrichsen y Ryan, 1981; Portillo y Pásaro, 1988a; Núñez-Abades y cols., 1992). Sin embargo, en el trabajo de Bieger y Hopkins (1987) se expone que existe una separación física entre las motoneuronas que inervan el músculo cricotiroideo y las del resto de los músculos intrínsecos laríngeos. A diferencia de lo que ocurre en los trabajos en el perro y el gato, en la mayoría de los estudios realizados en la rata los músculos tiroaritenoides y cricoaritenoides lateral son tratados como si fueran una única unidad, debido a la extrema cercanía de ambos músculos (Hinrichsen y Ryan, 1981; Flint y cols., 1991), aunque Portillo y Pásaro (1988a) si realizan un trazado retrógrado del músculo cricoaritenoides lateral y tiroaritenoides por separado, mostrando que el músculo tiroaritenoides está situado en posición más rostral que el cricoaritenoides lateral. Siguiendo este esquema de organización, según Portillo y Pásaro (1988a) las motoneuronas que inervan el músculo cricoaritenoides posterior estarían situadas en posición rostral en comparación con aquellas que inervan los músculos tiroaritenoides y cricoaritenoides lateral. Berkowitz y colaboradores (1999), en estudios de estimulación antidrómica y trazado del músculo cricoaritenoides posterior de la rata, describen una localización de las motoneuronas similar a las de Portillo y Pásaro (1988a). Otros autores, en cambio, describen una localización dispersa de las motoneuronas que inervan todos los músculos, a excepción del músculo cricotiroideo, con regiones extensas de solapamiento entre las diferentes poblaciones (Hinrichsen y Ryan, 1981; Flint y cols., 1991). Por último, a diferencia de los autores anteriormente citados, en el estudio de Flint y colaboradores (1991) se establece que las neuronas que inervan los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides se encuentran dispersas y entremezcladas en una columna rostrocaudal en el núcleo ambiguo pero, sin embargo, se distribuyen separadas entre sí de acuerdo a un eje lateromedial, situándose las motoneuronas del músculo cricoaritenoides posterior en posición medial, y las del tiroaritenoides en posición lateral (tabla 2).

AUTOR	ANIMAL	TÉCNICA	REPRESENTACIÓN LARÍNGEA
Hinrichsen y Ryan, 1981	Rata	Inyecciones de HRP	En el NA. CT rostral. CAP caudal. TA-CAL meseta homogénea anterior y posterior al óbex.
Bieger y Hopkins, 1987	Rata	Inyecciones de CTb-HRP	En NA. CT rostral. Resto caudal separado por representación faríngea.
Portillo y Pásaro, 1988a	Rata	Inyecciones de HRP, TB, DY	En el NA. CT en rostral. TA y CAP disperso rostral al óbex y caudal al CT. CAL caudal al óbex.
Flint y cols., 1991	Rata	Inyecciones de HRP, DY y TB	En el núcleo ambiguo. CAP TA/CAL a lo largo de todo el NA. Separación lateromedial: CAP en posición medial y TA/CAL en lateral.
van Daele y Cassell, 2009	Rata	Inyección de trazador transneuronal	TA ocupando un área de 0,7 mm rostral al óbex
Berkowitz y cols., 1999	Rata	Inyección de CTb y estimulación antidrómica	CAP en posición caudal con respecto al CT

**Tabla 2.** Diversos estudios sobre la somatotopía de los músculos laríngeos realizados exclusivamente en la rata.

CAP. Músculo cricoaritenideo posterior. CT. Músculo cricotiroides. CAL. Músculo cricoaritenideo lateral. TA. Músculo tiroaritenideo. NA. Núcleo ambiguo.

CTb. Toxina colérica. HRP. Peroxidasa de rábano picante. TB. True Blue. DY. Diamino Yellow.

#### 4.4 Número de neuronas

No todos los trabajos que han estudiado la localización de las neuronas que inervan los músculos laríngeos hacen mención al número de neuronas identificadas. En los trabajos que si lo hacen en el gato, el trazado de los músculos intrínsecos laríngeos muestra resultados diferentes entre los autores. En el artículo de Gacek (1975), en el gato recién nacido, el número de neuronas contabilizadas es superior al de otros autores (Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984). El número de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior es similar al del músculo tiroaritenideo en el estudio de Gacek (1975). En cambio, en el trabajo de Pásaro y colaboradores (1983) el número de neuronas trazadas es mayor en el músculo cricoaritenideo posterior que el obtenido tras la inyección combinada de los músculos tiroaritenideo y cricoaritenideo lateral. Por otro lado, en el artículo de Davis y Nail (1984) es el trazado del músculo cricoaritenideo posterior el que rinde un número inferior de

neuronas al obtenido por la inyección de los otros dos músculos. Estos resultados observados en el gato son similares a los registrados en el trazado de la laringe del conejo (Davis y Nail, 1984) y en el perro (Hisa y cols., 1984a) (tabla 3).

AUTOR	ANIMAL	TÉCNICA	REPRESENTACIÓN LARÍNGEA
Gacek, 1975	Gato recién nacido	Inyecciones de HRP	CT = 320 - 354 CAP = 11 - 230 TA = 54 - 226 CAL = 35
Pásaro y cols., 1983	Gato	Inyecciones de HRP	CT = 85 - 157 ( $\bar{x}$ = 113) CAP = 169 - 209 ( $\bar{x}$ = 189) TA/CAL = 78 - 221 ( $\bar{x}$ = 133)
Davis y Nail, 1984	Gato	Inyecciones de HRP	CT = 120 - 160 CAP = 111 TA/CAL = 206 - 288
Davis y Nail, 1984	Gato recién nacido	Inyecciones de HRP	CT = 120 - 160 CAP = 130 TA/CAL = 82 - 162
Davis y Nail, 1984	Conejo	Inyecciones de HRP	CT = 97 - 105 CAP = 205 TA = 70 - 265 CAL = 112 - 265
Hisa y cols., 1984a	Perro	Inyecciones de trazadores fluorescentes	CT = 100 - 130 CAP = 100 - 130 TA = 100 - 130 CAL = 80 - 100 A = 80 - 100

**Tabla 3.** Número de neuronas trazadas desde los diferentes músculos en animales diferentes de la rata.

A. Músculo aritenoides. CAP. Músculo cricoaritenoides posterior. CT. Músculo cricotiroides. CAL. Músculo cricoaritenoides lateral. TA. Músculo tiroaritenoides. HRP. Peroxidasa de rábano picante.  $\bar{x}$ . Media.

En la rata podemos encontrar resultados aún más variables, si cabe, en el número de neuronas trazadas desde los músculos intrínsecos de la laringe que los observados en otros animales. El mayor número de neuronas identificado tras el trazado del músculo cricoaritenoides posterior aparece en el trabajo de Berkowitz y colaboradores (1999) que supera al contabilizado por otros autores (Hinrichsen y Ryan, 1981; Portillo y Pásaro, 1988a; Flint y cols, 1991). Desgraciadamente, ninguno de los otros músculos intrínsecos laríngeos fue trazado para poder ser comparado. En el resto de los artículos consultados, el número de neuronas trazadas desde los músculos tiroaritenoides y cricoaritenoides posterior es parecido. En otro sentido, en el trabajo de Hinrichsen y Ryan (1981) el número de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior es inferior al conjunto de neuronas identificadas desde los músculos tiroaritenoides y cricoaritenoides lateral. Sin embargo, en el

trabajo de Portillo y Pásaro (1988a) ocurre a la inversa: el número de neuronas contabilizado desde el músculo cricoaritenosoideo es superior al registrado en el trazado del músculo tiroaritenosoideo (tabla 4).

AUTOR	ANIMAL	TÉCNICA	REPRESENTACIÓN LARÍNGEA
Hinrichsen y Ryan, 1981	Rata	Marcaje por HRP	CT = 50 – 92 CAP = 23 – 54 TA/CAL = 49 - 109
Portillo y Pásaro, 1988a	Rata	Marcaje por HRP, TB, DY	CT = 50 – 70 CAP = 30 – 90 TA = 38 - 52 CAL = 30
Flint y cols., 1991	Rata	Marcaje por HRP, TB, DY	CAP = 60 TA/CAL = 50
Berkowitz y cols., 1999	Rata	Inyección CTb y estimulación antidrómica	CAP = 175

**Tabla 4.** Número de neuronas marcadas desde los diferentes músculos en la rata.

A. Músculo aritenosoideo. CAP. Músculo cricoaritenosoideo posterior. CT. Músculo cricotiroideo. CAL. Músculo cricoaritenosoideo lateral. TA. Músculo tiroaritenosoideo. NA. Núcleo ambiguo. CTb. Toxina colérica. HRP. Peroxidasa de rábano picante. TB. True Blue. DY. Diamino Yellow.

## 5. ESTRUCTURA DEL NERVIIO

Los nervios forman parte del sistema nervioso periférico, la parte del sistema nervioso que se encuentra fuera de la columna vertebral y el cráneo. Las fibras nerviosas encargadas de transmitir los impulsos nerviosos desde/hacia el sistema nervioso central se agrupan en haces fascículos rodeados por una serie de envueltas de tejido conectivo. Estas envueltas son tres, y se describen como sigue:

Epineuro. Es la envuelta más externa, de tejido conectivo laxo compuesto por haces de colágeno de tipo I, dispuestos de manera paralela a los fascículos nerviosos. La densidad de estos haces es mayor en la superficie y va disminuyendo según se profundiza. También contiene fibras elásticas longitudinales, tejido adiposo y numerosos vasos sanguíneos extrínsecos (*vasa nervorum*). Constituye una barrera que delimita el nervio de las estructuras adyacentes, a la vez que facilita su deslizamiento, protegiendo así a los fascículos nerviosos (Sunderland, 1978; Berthold y cols., 2005).

Perineuro. Está constituido por laminillas paralelas que rodean cada fascículo nervioso. Dichas laminillas están formadas por fibroblastos modificados y fibras de colágeno dispuestas en varias direcciones. Gracias a esta configuración el perineuro funciona como una estructura de protección de las fibras nerviosas, así como constituyendo una barrera hematoneural. Esta barrera permite el paso selectivo de sustancias vitales para las células nerviosas y bloquea la difusión del contenido iónico que utilizan las fibras nerviosas. Durante la degeneración de una neurona, el perineuro se invagina para mantener la presión interna hasta que el espacio vuelve a ser ocupado por una nueva fibra nerviosa a causa de la regeneración anterógrada de la neurona. Un daño en el perineuro que suponga un quebranto del equilibrio osmótico mantenido por la barrera hematoneural afecta a las fibras que están cercanas a la zona de lesión (Sunderland, 1978; Berthold y cols., 2005).

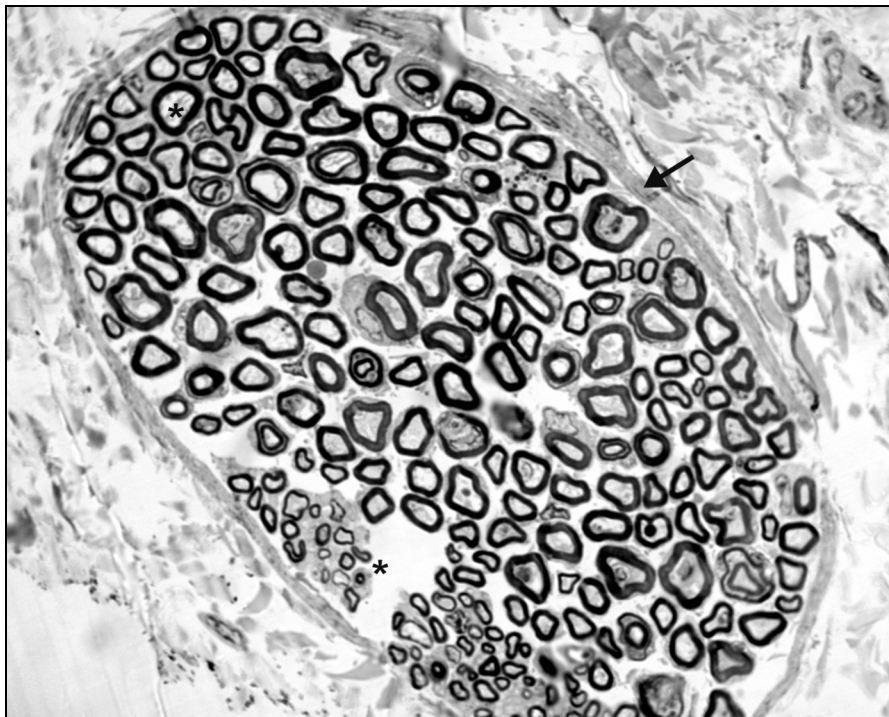
Endoneuro. Es el tejido conjuntivo que rellena los espacios que quedan entre las fibras nerviosas dentro de un fascículo, delimitado éste periféricamente por la laminilla más interna del perineuro y constituye septos que parcialmente dividen el conjunto de las fibras nerviosas. Está constituido por fibroblastos y fibras de colágeno distribuidas de manera longitudinal y oblicua. Además de fibroblastos, también hay presentes macrófagos, mastocitos y leucocitos que proceden de los pequeños capilares sanguíneos embebidos en el endoneuro (Berthold y cols., 2005). La protección de las fibras nerviosas es la principal función del endoneuro, ofreciendo resistencia a la elongación durante los trabajos de tensión del nervio. Por otra parte, ayuda, junto con el perineuro, a mantener la presión interna del fascículo durante los procesos de degeneración-regeneración de las fibras nerviosas (Sunderland, 1978). También rellena el espacio dejado por las fibras nerviosas que van degenerando a lo largo de toda la vida del individuo (Sunderland, 1978; Berthold y cols., 2005).

Con relación al modo en el que los axones quedan envueltos por las células gliales, hay dos tipos de fibras nerviosas en un nervio: fibras mielínicas y fibras amielínicas.

*Fibras mielínicas*. El axón proveniente desde el cuerpo de la neurona está cubierto de manera prácticamente continua por numerosas células de Schwann a intervalos regulares en todo su recorrido. El intervalo entre dos células de Schwann adyacentes recibe el nombre de nodo de Ranvier y el tramo de axón cubierto por cada célula de Schwann se denomina internodo. El principal componente de la membrana citoplasmática de la célula de Schwann es la mielina

(constituido por lípidos complejos y colesterol) y es debido a ello que se le denomina vaina de mielina a la célula de Schwann en su configuración madura. Durante el desarrollo las células de Schwann rodean concéntricamente su citoplasma alrededor de cada axón. De acuerdo al número de vueltas el grosor de la vaina de mielina es mayor. Sin embargo, en la región adyacente al nodo de Ranvier (paranodo) el grosor de la vaina se adelgaza y el del axón se incrementa ligeramente. En el propio nodo de Ranvier la mielina está ausente. En el intervalo internodal la apariencia es la de capas que se apilan unas sobre otras, a excepción de pequeñas separaciones entre las espiras a intervalos regulares, que se forman por el secuestro de membrana plasmática, denominadas cisuras de Schmidt-Lantermann (Berthold y cols., 2005). El diámetro de las fibras mielínicas varía entre 1 y 20  $\mu\text{m}$ , siendo la velocidad de conducción mayor a mayor diámetro de la fibra (figura 5) (Sunderland, 1978; Berthold y cols., 2005).

*Fibras amielínicas.* Están constituidas por un agregado de varios axones englobados por una única célula de Schwann, que los rodea con una expansión citoplasmática simple. A diferencia de las fibras mielínicas, estas células no poseen nodos de Ranvier (Berthold y cols., 2005). El diámetro de las fibras amielínicas varía de 0,1 a 3  $\mu\text{m}$  (Sunderland, 1978; Berthold y cols., 2005).



**Figura 5.** Imagen de un nervio laríngeo recurrente de la rata seccionado transversalmente que muestra el epineuro (señalado con una flecha) y en su interior las fibras nerviosas mielínicas (\*)



## **5.1 Proceso de degeneración en un nervio**

Desde finales del siglo XIX diversos investigadores han venido determinando los procesos y la cronología que acontecen después de la lesión traumática de un nervio (Ramón y Cajal, 1914). El daño producido a una fibra nerviosa depende del tipo de lesión, del sitio donde se produce y de la intensidad del mismo. Los diferentes tipos de lesiones generan diferentes grados de daño, resumidos en cinco niveles según la clasificación descrita por Sunderland (1978):

### **Grado 1.**

Consiste en una pérdida temporal de la conducción sin discontinuidad física en el axón entre el cuerpo de la neurona y el órgano que inerva. Aunque puede existir una pequeña desmielinización de la fibra en el sitio de lesión, la excitabilidad de la membrana por debajo del sitio de lesión se mantiene y la conductividad de la fibra se recupera completamente una vez que la causa de la lesión desaparece. Este tipo de lesión recibe el nombre de neuropraxia de acuerdo a la clasificación de Seddon (1942).

### **Grado 2.**

También se conoce como axonotmesis (Seddon, 1942). El axón queda interrumpido y degenera distalmente, en un proceso conocido como degeneración walleriana, que también afecta a una parte del cabo central del nervio lesionado. Esta degeneración del axón es acompañada por la vaina de mielina que rodea los axones. Al perderse la continuidad física de la fibra, la función motora y sensitiva se pierde. La estructura general del tubo endoneural, del perineuro y del endoneuro se mantiene estable durante el proceso de degeneración/regeneración. Sin embargo, los somas de las neuronas afectadas también van a experimentar cambios durante este proceso. En una segunda fase, solapada en el tiempo con la fase degenerativa, desde el cabo central se inicia un proceso regenerativo con objeto de recuperar la continuidad de la neurona con el órgano que inerva (Ramón y Cajal, 1914; Sunderland, 1978). La fase regenerativa está influenciada por el estado del endoneuro, ya que es por el tubo endoneural por donde transcurre la regeneración del axón. En este grado de lesión las paredes del tubo endoneural se encuentran en buen estado y por lo tanto el proceso regenerativo es dirigido, lo que implica que la regeneración se produce rápidamente (Sunderland, 1978).

**Grado 3.**

Es una lesión que afecta a todo el fascículo nervioso. No solo se lesionan las fibras nerviosas que degeneran, si no que el daño alcanza al endoneuro. El perineuro, sin embargo, aparece levemente afectado. Los efectos inmediatos pueden ser hemorragia, edema, isquemia y fibrosis intrafascicular. Todas estas consecuencias de la lesión implican un obstáculo a la regeneración de las fibras nerviosas. La lesión puede ser la tracción del nervio con rotura de las fibras sin que se afecte el perineuro o la compresión producida por la isquemia de alguno de los vasos que transcurren por el interior del perineuro. La degeneración walleriana se produce de manera similar a la del grado 2, sin embargo, si la lesión se produce próxima a los cuerpos neuronales, puede conducir a la muerte neuronal.

La fase regenerativa se ve afectada por una serie de inconvenientes. En primer lugar, con el aumento de la severidad de la lesión la recuperación de las neuronas para iniciar la regeneración es más prolongada. En segundo lugar, la fibrosis en la región lesionada dificulta que los nuevos axones que crecen desde el cabo central atraviesen eficazmente la cicatriz. Por último, con la destrucción de los tubos endoneurales en la zona donde se ha producido la lesión, el axón en crecimiento puede ser reconducido por un tubo distinto al que le corresponde y, por consiguiente, alcanzar una diana diferente a la que tenía. Si esta diana es de función parecida a la original, las consecuencias de una reinervación no dirigida son poco perceptibles. Pero cuando el fascículo transporta los axones a estructuras de función distinta, es decir, que se produce una reinervación inespecífica, se afecta gravemente la funcionalidad de estas estructuras.

**Grado 4.**

La lesión no solo afecta a los fascículos, si no que afecta a la capa perineural de todos los fascículos contenidos en el nervio. Solo se conserva intacto el epineuro. La formación de tejido conectivo, proliferación de las células de Schwann y crecimiento de los axones desde el cabo central puede ensanchar la región donde la lesión ha sido producida (neuroma). Las fases degenerativa y regenerativa son similares a las del tercer grado, con la diferencia de que el efecto en los somas de las neuronas afectadas es más severo, aumentando la tasa de muerte neuronal. Por otro lado, con la rotura del perineuro las fibras que crecen desde el cabo central

pueden prolongarse por el espacio interfascicular. La recuperación de la funcionalidad de las estructuras denervadas es muy reducida.

### **Grado 5.**

También conocido como neurotmesis (Seddon, 1942). El grado máximo de lesión en un nervio implica la pérdida de la continuidad física de todas las estructuras nerviosas incluyendo al epineuro. Si los extremos son unidos, las fibras en crecimiento se enfrentan a una extraordinaria barrera constituida por tejido conjuntivo en la cicatriz que dificulta el proceso regenerativo. Muchos de los axones no logran salir del cabo central y, para aquellos que lo consiguen, las posibilidades de que una vez superada la cicatriz alcancen los tubos endoneurales son reducidas. Además, el daño es tan severo que un gran número de neuronas pueden entrar en apoptosis.

Independientemente de la causa y la severidad de la lesión, los procesos de degeneración de las fibras nerviosas son similares. En las primeras 24 horas de haberse producido la lesión la estructura de las fibras mielínicas en torno al punto de la lesión esta poco modificada. En caso de haberse producida una sección, la vaina de mielina aparece retraída dejando al descubierto un fragmento del axón (Ramón y Cajal, 1914). En el caso de haberse producido una compresión o un aplastamiento, la presión intraxonial aumenta en el punto donde se ha producido el daño y se transmite hasta los nodos de Ranvier a ambos lados de la lesión. En los intervalos nodo-internodo-nodo se produce un desplazamiento, sufriendo los segmentos paranodales una modificación estructural (Sunderland, 1978; Burns, 2005).

Las células de Schwann sufren cambios importantes a partir de las 24 horas. La fragmentación de la mielina que empezó a las pocas horas, progresivamente se generaliza por todo el cabo periférico hasta el cuarto día, donde se observa que esta fragmentación es completa. Al mismo tiempo las células de Schwann se dividen y agrupan, manteniendo la lámina basal de las fibras nerviosas para el posterior proceso regenerativo. En los axones, progresivamente se desestructura el citoesqueleto y, desde el segundo día, se degradan dentro de unas cámaras de digestión que no son más que las células de Schwann modificadas (Ramón y Cajal, 1914). En estos días existe una señalización desde las células de Schwann y macrófagos denervados que van a atraer linfocitos T, neutrófilos y macrófagos para combatir la inflamación (Hall, 2005). Finalmente, a la segunda semana los axones y las células de Schwann

son totalmente degradados, concluyendo el proceso degenerativo a los 30 días (Ramón y Cajal, 1914; Sunderland, 1978). En el cabo periférico, los músculos inervados por las fibras lesionadas sufrirán un proceso de atrofia por denervación.

En las fibras amielínicas el proceso degenerativo se inicia más tarde que en las fibras mielínicas. Hasta el quinto día no se observan cambios morfológicos que consisten en una ramificación y posterior degeneración de las fibras en el segmento periférico del nervio. Hacia el décimo día la degradación de estas fibras parece haber concluido (Ramón y Cajal, 1914).

En el cabo central, las fibras densamente mielinizadas también experimentan un proceso degenerativo, pero solo en un pequeño intervalo de varios segmentos internodales de las vainas de mielina proximales. Sin embargo, las fibras amielínicas o escasamente mielinizadas apenas sufren ninguna alteración (Ramón y Cajal, 1914; Hall, 2005).

El soma neuronal experimenta cambios en su morfología a partir de las 6 horas de producirse la lesión. El núcleo se desplaza a la periferia, la membrana plasmática presenta invaginaciones y el nucleolo se agranda. Hacia el cuarto día después de producirse la lesión se alcanza el pico del proceso en el soma. Los gránulos de Nissl están dispersos por todo el citoplasma y el cuerpo neuronal aparece agrandado. Asimismo, los restantes orgánulos también aparecen alterados en este proceso. El aparato de Golgi se sitúa en la periferia de la célula, los lisosomas aumentan de número y el citoesqueleto se desestructura temporalmente. Es este punto el que representa la transición entre la respuesta al daño causado a la neurona y el inicio de la regeneración desde el cabo central (Sunderland, 1978). Mientras estas transformaciones son generadas en el cuerpo neuronal, la población glial de las inmediaciones empieza proliferar a partir de las 24 horas de haberse producido la lesión como respuesta al proceso que sufren las neuronas lesionadas. Los astrocitos aumentan de tamaño y muestran e incrementan su actividad para facilitar la regeneración, mejorando el transporte de sustancias desde los vasos sanguíneos hacia la neurona. La microglía, en cambio, solo actúa en procesos de lesión severa en la eliminación de conexiones sinápticas hacia el cuerpo neuronal (Sunderland, 1978; Hydman y cols., 2005).

## **5.2 Proceso de regeneración en un nervio**

El proceso de regeneración consiste en el crecimiento del axón desde el cabo central para reemplazar la porción de la fibra que ha degenerado como consecuencia de la lesión. Al igual que en la degeneración, el proceso de regeneración se puede resumir en una serie de etapas (Sunderland, 1978):

- 1º Recuperación de la neurona de los efectos retrógrados de la lesión.
- 2º Crecimiento del cono axónico hacia el lugar de la lesión.
- 3º Paso del axón a través del área de lesión.
- 4º Crecimiento del axón por el tubo endoneural distal al lugar lesionado.
- 5º Restauración de la sinapsis con el órgano diana.
- 6º Maduración de las nuevas fibras formadas dentro del tubo endoneural, lo que implica la restauración de la constitución anatómica y de las propiedades fisiológicas de la fibra nerviosa.
- 7º Recuperación de la función del órgano por la reinervación con un número suficiente de nuevas fibras nerviosas.

La recuperación de la maquinaria celular previa al daño producido depende del grado de lesión. Cuando la lesión no ha afectado a las paredes del tubo endoneural (hasta el grado 2) la recuperación se produce a los pocos días del daño. Sin embargo, cuando la lesión es igual o superior al grado 3, lo que implica la desestructuración del endoneuro, la recuperación puede extenderse durante varios meses (Sunderland, 1978).

Si el tubo endoneural no ha sido afectado, el axón en regeneración atraviesa el sitio de lesión sin dificultades y el cono axónico continua con el crecimiento. Si, por el contrario, el endoneuro se encuentra afectado y el tejido conectivo formado tras la lesión ocupa toda la cicatriz, el paso de los axones hacia los tubos endoneurales situados distalmente se produce mucho más lentamente. Este cruce de los axones hacia el cabo periférico puede registrarse más rápidamente en lesiones por aplastamiento (de 3 a 20 días) que en aquellas producidas por sección y que requieren sutura para restablecer la continuidad del epineuro. Además, el número de ramas de los axones que crecen es menor en la lesión por aplastamiento que la realizada por sección. Una vez atravesada la cicatriz, los axones alcanzan los tubos

endoneurales situados distalmente a la lesión del nervio. Alcanzado el órgano diana el axón empieza a crecer en espesor. En la mayoría de los casos una fibra ocupará finalmente cada tubo por degeneración de los axones colaterales, aunque en algunos casos varias fibras pueden ocupar un solo tubo endoneural (Sunderland, 1978).

Durante el proceso de reinervación el cono axónico va abriendo camino, mientras que las células de Schwann van cubriendo los axones. La mielinización comienza a partir del séptimo día después de producirse la lesión y la mielina necesaria para formar la vaina es de nueva síntesis. Los axones estarán envueltos en mielina a partir de la tercera o cuarta semana después de una lesión por aplastamiento pero la maduración total de la fibra nerviosa no se alcanza hasta un año después de haberse producido la lesión (Sunderland, 1978).

### **5.3 Modelos animales de degeneración y regeneración de los nervios**

El principal modelo animal en el que se ha estudiado el proceso que sigue a una lesión en el nervio es la rata, si bien también se han desarrollado en otras especies como el ratón, el cobaya o el conejo (Ijkema-Paassen y cols., 2004). El nervio preferido en este tipo de estudios es el nervio ciático. Sin embargo, este nervio aparte de contener fibras nerviosas motoras, también contiene fibras autónomas y sensitivas que pueden afectar la interpretación del proceso regenerativo por la aparición de dolor neuropático en el miembro operado (Ijkema-Paassen y cols., 2004; Griffin y cols., 2010). Además del nervio ciático, otros nervios utilizados son el hipogloso, el trigémino, el facial, el oculomotor, el troclear, el tibial, el femoral, el laríngeo recurrente o las ramas terminales del plexo braquial (Mizumo y cols., 1980; Thomander, 1984; Aldskogius y Thomander, 1986; Scherer, 1986; Sibony y cols., 1986; Brushart, 1988, 1993; Murphy y cols., 1990; Flint y cols., 1991; Fernandez y cols., 1992; Nahm y cols., 1993; Streppel y cols., 1998; Asahara y cols., 1999; Choi y cols., 2002; Guntinas-Lichius y cols., 2002, 2005; Kamijo y cols., 2003; Choi y Raisman, 2004; Ijkema-Paassen y cols., 2004; Hydman y cols., 2005; Redett y cols., 2005; Franchi y cols., 2006; Katada y cols., 2006; Robinson y Madison, 2006; de Ruiter y cols., 2008; Grosheva y cols., 2008; Hydman y Mattsson, 2008 y 2009; Pascual-Font y cols., 2008; Skouras y cols., 2011).

Existen varios métodos que valoran el proceso de reinervación de las estructuras denervadas. Una primera aproximación es la observación física y la elaboración de pruebas que determinen la funcionalidad del órgano reinervado. En la regeneración del nervio ciático, por ejemplo, se valora la evolución en el tiempo de la calidad de la pisada de la pata afectada (Ijkema-Paassen y cols., 2004; de Ruiter y cols., 2008), mientras que para el nervio facial se valora el movimiento de las vibras del lado lesionado (Thomander, 1984; Asahara y cols., 1999; Choi y cols., 2002; Guntinas-Lichius y cols., 2002, 2005; Kamijo y cols., 2003; Grosheva y cols., 2008; Skouras y cols., 2011). En el caso de la laringe, se observa la evolución de la motilidad del pliegue vocal afectado por la lesión del nervio recurrente (Marie y cols., 1989; de Corgnol y cols., 2011; Paviot y cols., 2011). En combinación con la observación directa, la electromiografía proporciona datos de la acción de los músculos afectados (Marie y cols., 1989; Flint y cols., 1991; Nahm y cols., 1993; Shiotani y cols., 2001; McRae y cols., 2009; de Corgnol y cols., 2011; Paviot y cols., 2011). El análisis post-mortem del músculo mediante técnicas inmunohistoquímicas puede valorar el proceso de denervación y reinervación del músculo (Shiotani y cols., 2001; Ijkema-Paassen y cols., 2004; Li y cols., 2004; Rhee y cols., 2004; Griffin y cols., 2010).

## **6. MODELOS DE DEGENERACIÓN / REGENERACIÓN**

### **6.1 Sincinesias**

La sincinesis es la realización de movimientos musculares involuntarios que acompañan a los movimientos voluntarios de un grupo muscular por una reinervación inespecífica tras una lesión en el nervio. En la laringe, la manifestación visual de la sincinesis se aprecia como debilidad de los músculos, asincronía de los movimientos de abducción y aducción o competencia en la contracción de los músculos antagonistas (Crumley y McCabe, 1982; Crumley, 2000; Benjamin, 2003).

Una lesión en el nervio laríngeo recurrente inicia un proceso de reinervación desde el cabo central. Algunos de los axones crecen por fuera de los tubos endoneurales, alcanzan algún músculo laríngeo y son capaces de establecer de nuevo una sinapsis. Sin embargo la mayoría de los axones si que son reconducidos por las guías endoneurales, pero no van a crecer por los mismo tubos en los que estaban antes de la lesión. Como consecuencia, la mayoría de la

reinervación es de tipo inespecífico, aunque existen algunos casos clínicos en los que la fonación es recuperada (si bien ésta será de manera parcial), lo que sugiere la posibilidad de mecanismos que mejoran el proceso de reinervación (Crumley, 2000).

De acuerdo a la clasificación de Crumley (2000) la sincinesis laríngea puede dividirse en cuatro tipos. En el primer tipo la innervación inespecífica conduce a una parálisis parcial que no impide una fonación de calidad. Los otros tres tipos de sincinesis si que implican disfunciones en la laringe. Mientras que en el segundo tipo la observación de los pliegues laríngeos muestra temblores o movimientos impredecibles, el tercer y cuarto tipo muestran una inmovilidad total. Más concretamente, en el caso del tercer tipo de sincinesis el pliegue vocal paralizado se sitúa en posición medial en la aducción, lo que se puede explicar por una mayor reinervación del músculo cricoaritenoides lateral en comparación con el resto de los músculos (hiperaducción). En el cuarto tipo, la mayor reinervación se ha producido en el músculo cricoaritenoides posterior (hiperabducción). En este caso, cuando se analiza el estado de los pliegues vocales se puede observar una lateralización del pliegue vocal en el movimiento de abducción (Crumley 2000; Benjamin, 2003).

Una vez producida, existen escasos tratamientos que solventen la sincinesis laríngea. En los ensayos experimentales realizados en la rata, la inyección de neurotoxinas en los músculos tiroaritenoides y cricoaritenoides lateral mejora el movimiento de abducción del músculo cricoaritenoides posterior. Sin embargo, la funcionalidad del pliegue vocal no puede ser recuperada (McRae y cols., 2009).

## **6.2 Trasplantes de laringe**

En el año 1998 se realizó el primer trasplante de laringe (Strome y cols., 2001). Sin embargo, el paciente nunca recuperó la movilidad de los pliegues laríngeos y, a pesar de que ha pasado más de una década desde aquel primer intento, a día de hoy los trasplantes laríngeos no pueden realizarse con garantías de éxito. Una de las razones de la imposibilidad de implantar un protocolo de trasplante laríngeo no es la incapacidad técnica en la preservación de los tejidos del donante, puesto que existe un conocimiento acumulado en la conservación de órganos susceptibles de ser trasplantados. La intervención quirúrgica tampoco parece



presentar obstáculos insalvables, ya que la vascularización y conexión de los nervios de la laringe del donante en la nueva ubicación se realiza sin mayores inconvenientes (Birchal y cols., 2006; León y cols., 2008). Además, este tipo de intervenciones ha sido experimentada en roedores, mostrando que la cirugía es reproducible en animales de mayor tamaño, como los seres humanos, con un equipo quirúrgico adecuado (Lorenz y cols., 2002). Otro factor a tener en cuenta es anular la posibilidad de un rechazo del órgano transplantado. Con la actual oferta de fármacos inmunosupresores, la posibilidad de un rechazo en el transplante se reduce bastante, si bien los efectos secundarios derivados de la administración de estos fármacos estrecharían el abanico de pacientes seleccionables (León y cols., 2008). Finalmente, el último paso que debe ser superado, el factor limitante, es lograr una recuperación funcional de la laringe, no solo desde el punto de vista sensitivo, sino sobre todo motor. En el aspecto sensitivo el objetivo es recuperar la sensibilidad de manera que se puedan desencadenar los reflejos que habilitan las funciones protectoras de la laringe. Desde el punto de vista motor, el objetivo a conseguir es lograr la restitución de los movimientos de abducción y aducción glótica y reducir al mínimo la sincinesis laríngea. Desgraciadamente, en la consecución de estos dos objetivos es dónde han tropezado todos los esfuerzos y es en la actualidad el principal factor limitante para lograr el transplante de la laringe (Birchal y cols., 2006; León y cols., 2008).

### **6.3 Reinervación laríngea como factor limitante**

La denervación de los músculos intrínsecos laríngeos, como consecuencia de la lesión del nervio laríngeo recurrente, provoca que las funciones de deglución y producción de voz se vean alteradas de manera importante. En el mismo sentido pero de consecuencias más graves para el afectado, la incapacidad de completar el cierre glótico supone una amenaza vital al aumentar las posibilidades de entrada de sustancias y cuerpos extraños en la vía aérea (Sasaki, 2006). Como se ha descrito anteriormente, está aceptado que el nervio laríngeo recurrente contiene fibras motoras, sensitivas y autónomas. Se ha descrito que los axones simpáticos y parasimpáticos tienen la capacidad de regenerar y completar una efectiva unión neuromuscular en los músculos laríngeos (Flumerfelt y cols., 1986; Crumley, 2000).

Por otra parte, la reinervación del músculo cricoaritenideo posterior se encuentra en ventaja frente al resto de los músculos debido a que la rama abductora que inerva el músculo cricoaritenideo posterior es la primera en separarse del tronco principal del nervio laríngeo recurrente y la distancia recorrida por los axones es menor (Crumley, 2000).

Por último, tampoco puede descartarse el papel de la reinervación desde el nervio laríngeo superior y la posibilidad de que nervios vecinos puedan reinervar los músculos laríngeos denervados. Estas fibras pueden proceder de la rama terminal del músculo constrictor inferior, de la rama interna del nervio laríngeo superior, de ramas simpáticas y de las ramas motoras distribuidas dentro de la laringe (Kobler y cols., 1994; Crumley, 2000; Hydman y Mattsson, 2008; Martin-Oviedo y cols., 2011).

Los trabajos de degeneración y regeneración de los nervios laríngeos se han centrado en analizar el estudio de los cambios en la periferia y no tanto en los que acontecen en el tronco del encéfalo. Algunos de estos trabajos han consistido en realizar la conexión de la rama que inerva el músculo cricoaritenideo posterior con el nervio frénico, mientras que la rama aductora se conectaba con el asa cervical (Marie y cols., 1989; van Lith-Bijl y Mahieu, 1998). Los resultados en estos dos trabajos son dispares. En el trabajo de Marie y colaboradores (1989), desarrollado en perros, se mostró que solo en un caso de los siete analizados se produjo la reinervación con resultados positivos en los movimientos de abducción y aducción. En el trabajo de van Lith-Bijl y Mahieu, (1998) desarrollado en gatos, los resultados fueron mejores pero, a pesar de todo, si bien con esta técnica se puede mejorar los movimientos de apertura y cierre de la vía aérea con la actividad respiratoria, la posibilidad de recuperar la capacidad de generar voz sigue siendo muy limitada.

Los trabajos orientados a analizar los cambios en las neuronas del núcleo ambiguo que inervan los músculos intrínsecos de la laringe son escasos. En uno de ellos, Namh y colaboradores (1990) realizaron su estudio mediante la lesión por congelación del nervio laríngeo recurrente del cobaya, lo que produce una axonotmesis. Los animales fueron distribuidos en varios grupos de acuerdo a los tiempos de supervivencia de 3 días a 6 meses. Posteriormente, se inyectó HRP en el músculo cricoaritenideo posterior. Los resultados mostraron que había una pérdida de la somatotopía de las neuronas del músculo cricoaritenideo posterior. Además, la mayoría de las neuronas trazadas aparecen desplazadas

caudalmente, con respecto a la posición en los individuos no lesionados, en los animales con mayor tiempo de supervivencia después de la lesión. En el mismo sentido se determinó un cambio en el número de neuronas trazadas desde los 2 hasta los 6 meses, observándose un aumento hasta alcanzar un número similar al control. En el trabajo de Flint y colaboradores (1991), llevado a cabo en rata, se realizó otro tipo de lesión, sección y sutura del nervio laríngeo recurrente, lo que ocasiona una neurotmesis. Quince semanas después de la lesión se trazaron los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides/cricoaritenoides lateral con HRP y los retrotrazadores fluorescentes fast blue y diamino yellow. Los resultados mostraron una pérdida total de la somatotopía. Además, el número de neuronas trazadas se redujo a la mitad con respecto al control. Posteriormente, Namh y colaboradores (1993) trataron de determinar los procesos de reinervación laríngea después de una lesión del nervio laríngeo recurrente en el gato, empleando dos técnicas de lesión: por congelación de un tramo del nervio y por sección y sutura del nervio. Nueve meses después de las lesiones se analizó la movilidad de los pliegues vocales, se hizo electromiografía de los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides, y se inyectó HRP en el músculo cricoaritenoides posterior. Los resultados mostraron que en los animales de lesión por congelación (axonotmesis) tanto la movilidad de los pliegues vocales como el registro electromiográfico y el trazado con HRP son similares a los encontrados en los animales control. En los animales con el nervio laríngeo recurrente lesionado por sección y sutura (neurotmesis) los resultados en cuanto a la motilidad de los pliegues vocales y la electromiografía fueron negativos. Respecto a la localización, las motoneuronas trazadas desde músculo cricoaritenoides aparecían dispersas por toda la región del núcleo ambiguo que contiene las células cuyos axones son canalizados por el nervio laríngeo recurrente. Por último, los resultados cuantitativos del trabajo de Namh y colaboradores de 1993 contradicen lo expuesto en el trabajo de Flint y colaboradores (1991) porque, aunque fue realizado el mismo tipo de lesión en el nervio laríngeo recurrente, el número de neuronas identificadas en el trabajo de Namh y colaboradores (1993) es similar al registrado en el control, al contrario del trabajo de Flint y colaboradores (1991) que es la mitad al contabilizado en sus grupos control. Una posible explicación al menor número de neuronas contabilizado tras la lesión del nervio podría ser la muerte neuronal, pero esta posibilidad parece quedar descartada según el trabajo de Hydman y colaboradores (2005) en el que se determinó que, tras la sección del nervio laríngeo recurrente de la rata, no se observaba muerte neuronal.

Aun sin conocerse los cambios en la organización somatotópica en el núcleo ambiguo tras una lesión en el nervio laríngeo recurrente, se están estudiando tratamientos que traten de mejorar el proceso de reinervación desde el cabo central del nervio, usando como prueba positiva la observación de la motilidad del pliegue laríngeo paralizado y el análisis electromiográfico de los músculos intrínsecos laríngeos (McRae y cols., 2009; de Corgnol y cols., 2011; Paviot y cols., 2011).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 1. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de los cambios en la somatotopía de la musculatura intrínseca laríngea tras una lesión en el nervio laríngeo recurrente es fundamental para poder abordar de manera científica las dificultades que supone la reinervación laríngea, tanto en los casos de parálisis laríngeas como en las derivadas de la imposibilidad de lograr la realización de trasplantes de laringe completamente funcionales. En la literatura científica podemos encontrar diversos estudios de degeneración/regeneración del nervio laríngeo recurrente orientados en la periferia. Sin embargo, existe un mayor desconocimiento de los cambios en el núcleo ambiguo tras la lesión del nervio. Además, estos estudios se han realizado en diversos animales de experimentación y muestran variaciones no solo en el patrón somatotópico de las neuronas motoras de la musculatura intrínseca laríngea, sino también en los cambios de la somatotopía tras una lesión en el nervio. Por consiguiente, la ausencia de un modelo animal para el estudio de la reinervación de la musculatura intrínseca laríngea, así como la existencia de divergencias en los resultados de los trabajos que hemos consultado, nos ha llevado a un modelo en el que poder realizar un estudio sistemático de los cambios de la somatotopía que ocurren durante el proceso de reinervación. Tomando la rata (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley como modelo pretendemos obtener resultados que puedan arrojar luz sobre el desconocimiento que existe en este ámbito.

## 2. HIPÓTESIS

Las motoneuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo se distribuyen en el núcleo ambiguo de acuerdo a una columna rostrocaudal, con la localización de agrupaciones neuronales para cada uno de los dos músculos que van a ser constantes. Tras una lesión por aplastamiento en el nervio laríngeo recurrente izquierdo las neuronas que inervan estos dos músculos van a aparecer dispersas por el núcleo ambiguo y el pliegue vocal aparecerá paralizado. A lo largo del tiempo se van a observar cambios en la distribución de las motoneuronas, aunque nunca se alcanzará la situación previa a la lesión. Sin embargo, la motilidad del pliegue vocal se va a recuperar.

### **3. OBJETIVOS**

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, pretendemos alcanzar los siguientes objetivos:

1º. Identificar que posiciones ocupan en el núcleo ambiguo las neuronas que inervan los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides a diferentes tiempos después de la lesión por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente.

2º. Cuantificar el número de neuronas del núcleo ambiguo que inervan los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides a diferentes tiempos después de la lesión por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente.

3º. Describir los cambios en la organización somatotópica del componente laringomotor del núcleo ambiguo a lo largo de la evolución temporal de la lesión por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente.

4º. Describir los cambios en la motilidad de los pliegues laríngeos a diferentes tiempos tras la lesión en el nervio laríngeo recurrente.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. MODELO ANIMAL

La especie seleccionada para el desarrollo de este trabajo ha sido la rata albina (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawley, machos adultos jóvenes de entre 200 y 250 gramos de peso. Esta especie es comúnmente empleada por diversos grupos de investigación biomédica y más específicamente en los estudios de la inervación de la laringe y de los cambios que se producen tras la lesión de alguno de los nervios laríngeos, tanto periférica (Paviot y cols., 2011) como centralmente (Flint y cols., 1991). En contraste con otros modelos animales, como gatos (Gacek, 1975), perros (Szentágothai, 1943) o monos (Yoshida y cols., 1985), la rata ofrece ventajas como la facilidad de manipulación, su reducido coste de adquisición y mantenimiento, y la posibilidad de obtener resultados reproducibles en un plazo de tiempo razonable. Se ha elegido individuos del sexo masculino porque, a diferencia de las hembras, en los machos no se producen ciclos hormonales que afectan a su fisiología y comportamiento.

En este estudio fueron empleadas un total de 55 ratas. Los animales permanecieron estabulados en el animalario situado en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, dentro de un ambiente higiénico adecuado, con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y condiciones estables de temperatura (25°C) y humedad. Los animales disponían de libre acceso tanto al pienso como al agua.

Los ensayos efectuados en este estudio se han realizado cumpliendo las normativas vigentes en la Unión Europea (86/609 EEC) y España (RD 223/1998), y han sido aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estableció un grupo control y ocho grupos experimentales (tabla 5). El grupo control está formado por animales a los que se les inyectó un trazador retrógrado en los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides. Se eligieron estos músculos por estar ambos inervados por el nervio laríngeo recurrente, por realizar acciones antagónicas (abductora y aductora respectivamente) y por ser relativamente sencillos de abordar para la inyección del trazador. El sentido de este grupo control es establecer la organización somatotópica normal

de las neuronas del núcleo ambiguo que los inervan para, posteriormente, compararla con la de los grupos experimentales que han sufrido una lesión en el nervio laríngeo recurrente.

	Grupo control	Grupo 1 spl	Grupo 2 spl	Grupo 4 spl	Grupo 6 spl	Grupo 8 spl	Grupo 12 spl	Grupo 16 spl
n	5	6	9	6	7	8	7	7
spl: semanas post lesión. n. Número de animales por grupo								

**Tabla 5.** Cuadro resumen de los animales empleados distribuidos por grupos. La numeración de los grupos representa el número de semanas de supervivencia después de haber sido lesionado el nervio laríngeo recurrente.

Los grupos experimentales están constituidos por animales a los que se les realizó una lesión por aplastamiento en el nervio laríngeo recurrente y posteriormente, transcurridos los tiempos de supervivencia establecidos para cada grupo (1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 semanas), sus músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo fueron inyectados con el trazador, de la misma manera que en los controles, para poder proceder a analizar el patrón somatotópico de las neuronas trazadas y compararlo con el mapa normal. Los animales se distribuyeron en grupos con diversos tiempos de supervivencia post-lesión para determinar la secuencia cronológica de los cambios que se producen en el núcleo ambiguo.

### 3. TRAZADOR NEURONAL: LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA COLÉRICA

El compuesto seleccionado para el trazado de las neuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo ha sido la subunidad B de la toxina colérica (CTb). Dicho trazador es un derivado de la proteína causante de la enfermedad del cólera sintetizada por la bacteria *Vibrio cholerae* (Gemmell, 1984; de Haan y Hirst, 2004; Yanagisawa y cols., 2006). La proteína salvaje es una estructura hetero-oligomérica compuesta por una subunidad A, de tipo catalítico, y cinco subunidades B, que tienen afinidad por un gangliósido específico de la membrana plasmática de las células epiteliales intestinales también presente en la membrana de las neuronas. En la molécula trazadora, las subunidades A han sido eliminadas y son las subunidades B las que tienen la propiedad de ser incorporadas en los terminales sinápticos y transportadas en las vesículas en sentido retrógrado, si bien también puede usarse como trazador anterógrado (Peyron y cols., 1998; Vercelli y cols., 2000; Conte y cols., 2009). En comparación con otros trazadores, la CTb requiere un tercio del

tiempo que necesitan los dextranos (Vercelli y cols., 2000). La velocidad de difusión del dextrano es de hasta 1 mm a la hora (Fritzsche, 1993; Pascual-Font y cols., 2011) por lo que podemos calcular que la velocidad de la CTb es como máximo de 3 mm a la hora.

Por otra parte, la CTb puede conjugarse con sustancias como la HRP o la biotina, hecho que se emplea para mejorar la observación en microscopía de campo claro del trazado de los cuerpos neuronales y del árbol dendrítico (Dederen y cols., 1994; Vercelli y cols., 2000). También puede ser conjugada con compuestos fluorescentes como FITC (Fluoresceína-5-isocianato), TRITC (Tetrametil rodamina isotiocianato), con el fin de poder observar el trazado mediante técnicas de microscopía de fluorescencia (Dederen y cols., 1994). En este estudio hemos utilizado la CTb conjugada a los fluoróforos comerciales Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Oregon, EE.UU.). La decisión de elegir estos trazadores fluorescentes fue tomada porque han sido utilizados eficazmente en otros trabajos y sus señales son más intensas que las de otros compuestos fluorescentes (Niedringhaus y cols., 2008; Conte y cols., 2009). La CTb conjugada a Alexa Fluor 488 (CTb-AF488) emite fluorescencia de color verde (longitud de onda 488 nm). La CTb conjugada a Alexa Fluor 594 (CTb-AF594) emite fluorescencia de color rojo (longitud de onda 594 nm). Ambos productos se adquirirían comercialmente en forma de liofilizado y, para su conservación, se diluían en PBS y glicerol a partes iguales hasta alcanzar una concentración del 1%. Posteriormente, para poder ser empleados en el trazado neuronal, la mezcla se alicuotaba en volúmenes de 1 µl en tubos eppendorf de 0,2 ml conservados a -20°C hasta su utilización.

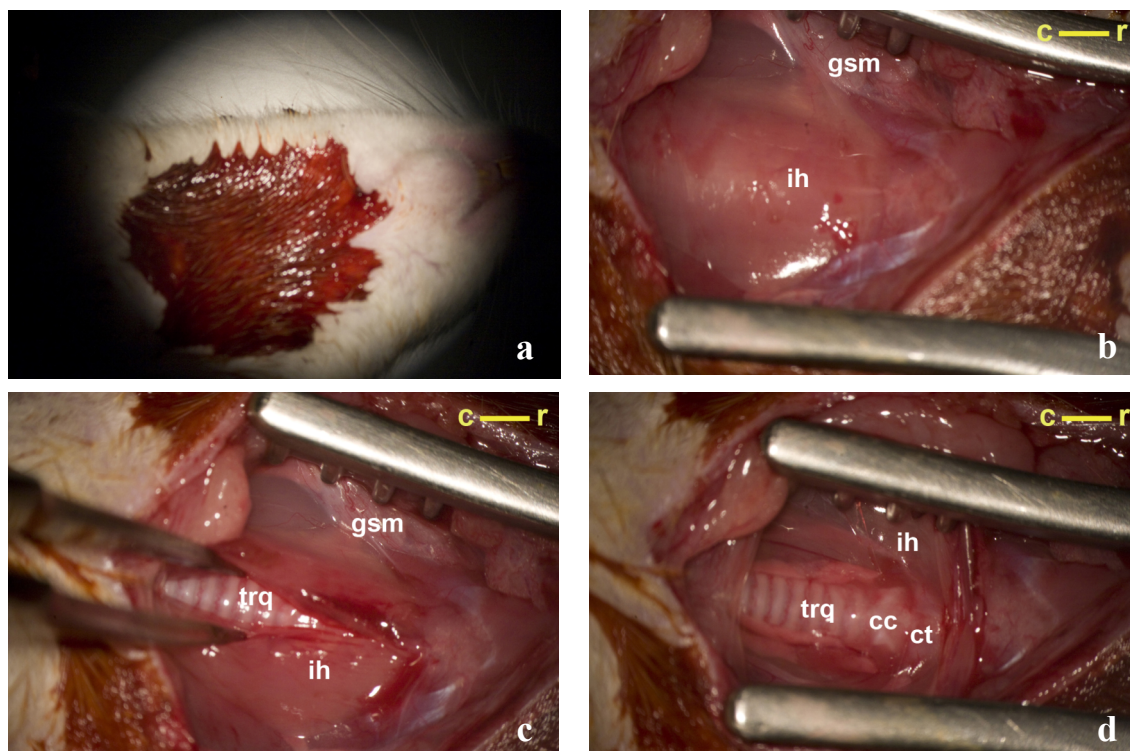
#### **4. TÉCNICA QUIRÚRGICA PARA LA APLICACIÓN DEL TRAZADOR**

Todas las cirugías han sido llevadas a cabo en los quirófanos habilitados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, con las condiciones asépticas y el instrumental adecuados para la intervención. A causa de lo reducido del campo quirúrgico y al pequeño tamaño de las estructuras manipuladas, todas las cirugías fueron efectuadas con la ayuda de un microscopio quirúrgico (Leica). Durante todo el proceso la temperatura corporal de los animales intervenidos fue controlada y regulada con un sistema de termómetro rectal acoplado a una manta térmica, con el objeto de mantener la temperatura corporal de los animales en 37°C hasta su completa recuperación de la anestesia.

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina (92 mg/kg) combinada con xilacina (8 mg/kg). Generalmente, esta dosis permitía realizar el protocolo en el tiempo de actuación de la anestesia (20-30 minutos). No obstante, si el animal mostraba indicios de recuperación de la anestesia, se aplicaba una nueva dosis correspondiente a 1/3 de la inicial. La analgesia post-quirúrgica de los animales se llevó a cabo con buprenorfina (0,02-0,1 mg/kg) más meloxicam (1-2 mg/kg) suministrados intraperitonealmente cada 8 horas durante al menos dos días. Después, se administró ibuprofeno por vía oral durante otros tres días más.

#### **4.1 Grupo control**

Tras comprobar la pérdida de reflejos en la rata por efecto de la anestesia, se rasuraba e impregnaba con povidona yodada la cara anterior del cuello del animal. Se realizaba una incisión longitudinal en la línea media del cuello y la piel. Las glándulas submandibulares y la musculatura infrahioidea eran rechazadas lateralmente mediante un separador hasta dejar expuestas la laringe, la tráquea y la glándula tiroides. El músculo tiroaritenoso era accesible tras practicar una pequeña ventana en el cartílago tiroides con unas tijeras oftalmológicas. La inyección de CTb se realizaba por medio de una jeringa Hamilton de 10 µl acoplada a una aguja de vidrio. El sistema jeringa-aguja se encontraba relleno de glicerina, para favorecer la salida de la solución del trazador. Debido a la proximidad con el músculo cricoaritenoso lateral la inyección se realizaba muy lentamente para evitar que se desbordase y, una vez finalizada, la aguja se mantenía durante dos minutos dentro del músculo para evitar la salida del trazador fuera del mismo. Después se limpiaba la zona de inyección con suero salino impregnado en un bastoncillo de algodón (figura 6).



**Figura 6.** Imágenes que muestran el acceso que se realizaba hasta la laringe. Tras impregnar con povidona yodada la parte anterior del cuello (a) se practicaba una incisión en la línea media y se separaban lateralmente las glándulas submandibulares (b). Con ayuda de unas pinzas de punta fina se separaban los músculos infrahioideos (c) para poder visualizar la parte anterior de la laringe (d).

r. rostral

c. caudal

cc. cartílago cricoides

ct. cartílago tiroideo

gsm. glándula submandibular

ih. musculatura infrahioidea

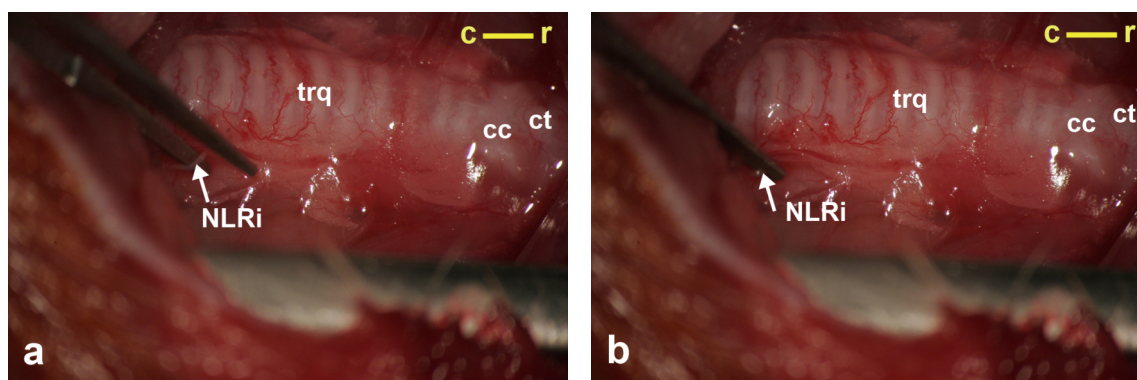
trq. tráquea

Para la inyección del músculo cricoaritenideo posterior era necesario rotar ligeramente la laringe. Primero se disecaba el músculo tirofaríngeo y las fibras del músculo cricofaríngeo del lado izquierdo para dejar la laringe parcialmente liberada. Después se colocaba debajo de la laringe una pieza de parafilm para aislarla durante el trazado del músculo cricoaritenideo posterior de las estructuras circundantes. En todo el proceso se ponía especial cuidado en evitar dañar el nervio laríngeo superior y el tronco principal de la arteria tiroidea superior. Al igual que en el protocolo del tiroaritenideo, tras la inyección la zona era limpiada cuidadosamente con suero salino. Una vez finalizada la cirugía, se cerraban los planos musculares y, tras suturar la piel, la región se desinfectaba nuevamente con povidona yodada.

## 4.2 Grupos experimentales

### Primera cirugía: lesión del nervio laríngeo recurrente

Tras anestesiarse a los animales se realizaba el abordaje de la cara ventral del cuello de la rata, tal y como se ha detallado en la cirugía de los grupos control. Una vez identificado el nervio laríngeo recurrente izquierdo, era disecado cuidadosamente y se lesionaba por aplastamiento con unas pinzas de punta fina, durante 10 segundos. Esta operación era repetida tres veces cambiando la dirección de cierre de las pinzas para asegurar que la lesión en el nervio era completa (figura 7). Todas las lesiones se realizaron en el plano de los 6º-7º anillos traqueales. Tras ser efectuada la lesión, se cerraban los planos musculares y se suturaba la piel.



**Figura 7.** Imágenes que muestran el método de lesión en el nervio laríngeo recurrente. El lugar de lesión estaba siempre ubicado entre el 6º y el 7º anillo traqueal. Una vez identificado el nervio (a), con unas pinzas de punta fina era lesionado por aplastamiento 3 veces en el mismo punto (b).

r. rostral

c. caudal

cc. cartílago cricoides

ct. cartílago tiroides

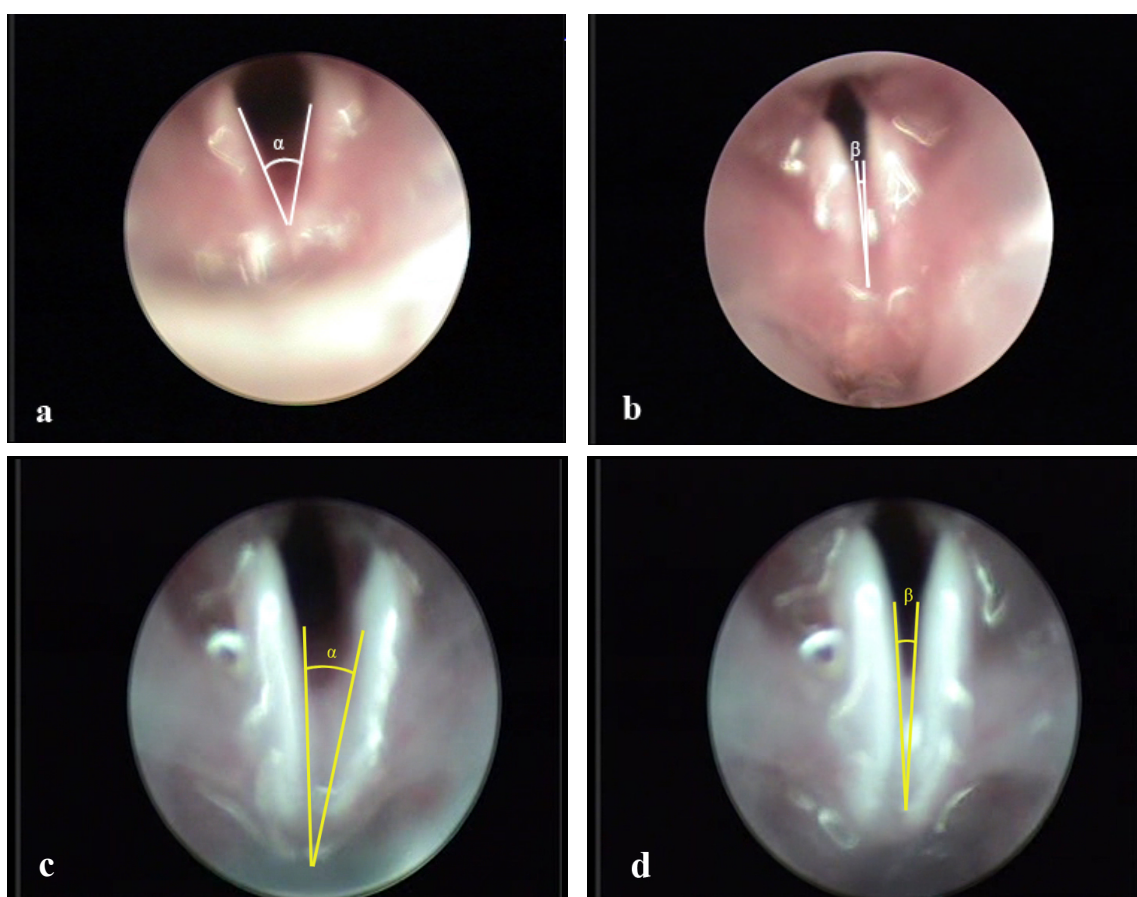
NLRI. nervio laríngeo recurrente izquierdo

trq. tráquea

Tras la completa recuperación de la cirugía, en cada rata se revisó la movilidad de los pliegues vocales mediante la observación directa de los mismos con un laringoscopio. Se comprobaba que la lesión en el nervio efectivamente determinaba la paralización del pliegue vocal izquierdo. La observación de los pliegues laríngeos fue realizada mediante un laringoscopio Storz (Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemania). Los videos fueron registrados en un monitor de endoscopia de Storz (Telecam SL NLSC 20212120, Karl Storz Endoskope). El protocolo de evaluación de la posición de los pliegues paralizados tras la lesión es el aplicado en el trabajo de Inagi y colaboradores (1997), también utilizado en otros



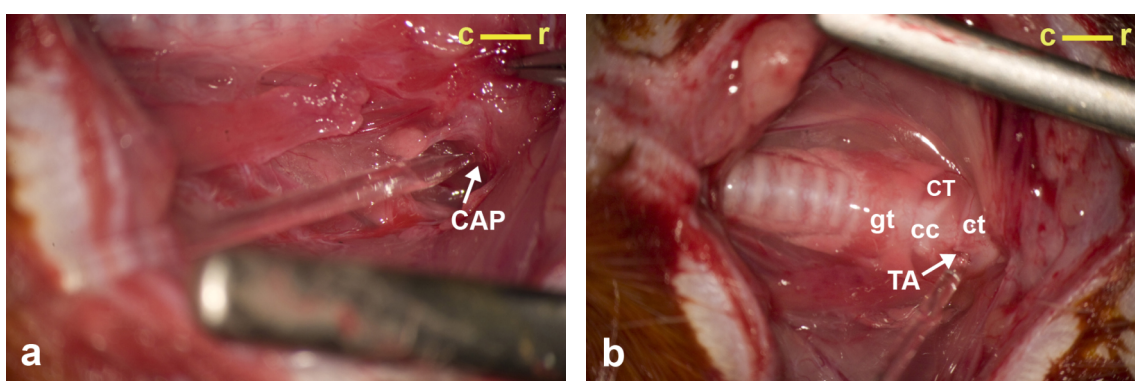
estudios (de Corgnol y cols., 2011; Paviot y cols., 2011). De cada video realizado se seleccionaron tres secuencias de apertura y cierre completo de los pliegues y, de cada una de ellas, se tomó un fotograma con los pliegues en abducción máxima y un fotograma con los pliegues en aducción máxima. Las imágenes de cada uno de los fotogramas se analizaron con el programa Image J para medir los ángulos entre las apófisis vocales. Los datos de todos los animales analizados se exportaron a un archivo de Excel en el que se determinó la media y la desviación típica de los ángulos de los pliegues en posición medial, paramediana y lateral. Para evaluar la recuperación del movimiento de los pliegues a diferentes intervalos de tiempo después de la lesión del nervio, se ha utilizado una variación del método utilizado por Marie y colaboradores (1989). Si en la observación del pliegue izquierdo éste permanecía totalmente paralizado se le registraba el valor 0. Si mostraba movimiento pero éste era muy restringido se le daba valor +. Por último, si el pliegue mostraba movimiento de abducción y aducción próximo al observado en los animales control se le daba un valor ++ (figura 8).



**Figura 8.** Imágenes obtenidas de dos de los videos grabados en sendas ratas, una con los pliegues vocales en movimiento (a y b) y otra con los pliegues vocales paralizados en posición paramediana (c y d). Las imágenes a y c están tomadas con los pliegues en abducción máxima mientras que b y d están tomadas con los pliegues en aducción máxima.  
 $\alpha$ : ángulo con los pliegues en abducción máxima.  
 $\beta$ : ángulo con los pliegues en aducción máxima.

### Segunda cirugía: trazado de las neuronas mediante inyección de CTb en los músculos

Tras la lesión del nervio laríngeo recurrente, los animales eran mantenidos durante los tiempos establecidos (tabla 5) antes de proceder a la inyección de CTb en los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides. Una vez cumplido el tiempo determinado para cada grupo experimental, se procedió a efectuar una segunda intervención quirúrgica para la inyección de los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides (figura 9). Tras anestesiarse al animal, y previamente a la cirugía, los pliegues vocales eran de nuevo observados con el laringoscopio para registrar la movilidad o no del pliegue laríngeo izquierdo y, en el caso de que el pliegue estuviese paralizado, anotar en qué posición se encontraba. Tras ello, se procedía a inyectar la CTb con el mismo protocolo descrito para los animales del grupo control. Completada la intervención se realizaba una nueva laringoscopia para asegurarse de que la cirugía no había provocado ningún cambio en el movimiento de los pliegues como consecuencia de una lesión fortuita en alguno de los nervios.



**Figura 9.** Fotografías tomadas durante la segunda cirugía que ilustran el proceso de inyección de la CTb. Para la inyección del músculo cricoaritenoides posterior la laringe era rotada ligeramente para acceder al músculo (a), mientras que para la inyección del músculo tiroaritenoides se practicaba una ventana en el cartílago tiroideo (b).

r: rostral

c: caudal

CAP: músculo cricoaritenoides posterior

TA: músculo tiroaritenoides

CT: músculo cricotiroideo

cc: cartílago cricoideo

ct: cartílago tiroideo

gt: glándula tiroidea



## **5. PROCESAMIENTO DEL TRONCO DEL ENCÉFALO**

Tres días después de la inyección de CTb en los músculos los animales eran sacrificados. En este intervalo de tiempo a una velocidad que hemos estimado de hasta 3 mm a la hora (Frizsch, 1993; Vercelli y cols., 2000) el trazador ha tenido tiempo más que suficiente para recorrer los 72 mm de longitud que existen entre los músculos intrínsecos laríngeos inervados por el nervio laríngeo recurrente izquierdo y la médula oblongada donde se encuentra el núcleo ambiguo (Pascual-Font y cols., 2011). El sacrificio de los animales se llevaba a cabo con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis letal (150 mg/kg). Una vez que los reflejos estaban abolidos por efecto del barbitúrico, se abría la cavidad torácica y se introducía en la arteria aorta, a través del ventrículo izquierdo, una cánula acoplada a una bomba peristáltica. A continuación se perfundían 200 ml de solución salina (4°C) seguidos sin interrupción de unos 300 ml de solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0,1 M; pH 7,4; 4°C).

Finalizada la perfusión, se extraía el tronco del encéfalo entre los niveles más craneales de la médula espinal y la transición de la protuberancia con el mesencéfalo. Se separaba el cerebelo por sección de los pedúnculos cerebelosos y, a continuación, se post fijaba el bloque por inmersión durante 2 horas en 20 ml de la misma solución fijadora. Previamente a la congelación las piezas eran sometidas a un proceso de crioprotección por inmersión en una solución de sacarosa al 15% en tampón fosfato (24 horas) para después cambiarlas a una solución concentrada al 30% (72 horas). Para congelarlos, los troncos eran embebidos en Tissue Tek y, finalmente, se seccionaban transversalmente a 50 µm de espesor en un criostato (Leitz Kryostat 1720) a -15°C. Las secciones se depositaban de manera seriada en pocillos que contenían tampón fosfato. Hasta el momento del montaje las placas con las secciones eran conservadas a 4°C.

En un paso previo al montaje de los cortes, las secciones fueron incubadas durante 10 minutos en una solución de DAPI (4',6 -Diamino-2-fenilindol di-clorhidrato) a una concentración de 1:1000. Esta molécula se une de manera inespecífica al surco menor de la hélice del ADN y, en las condiciones de iluminación adecuadas, permite identificar de manera inequívoca el núcleo y el nucleolo de las neuronas por la luz fluorescente azul en que emite. Las secciones fueron montadas de manera seriada en portaobjetos previamente tratados con

poli-L-lisina. Los portaobjetos con las secciones adheridas se dejaban secar al aire para, a continuación, ser deshidratados en una batería de alcoholes y ser cubiertos con un cubreobjetos con el medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Todas las preparaciones se mantenían en oscuridad a temperatura ambiente hasta el día siguiente en que eran observadas. En los días sucesivos eran almacenadas en oscuridad a 4°C.

## **6. MICROSCOPIA Y OBSERVACIÓN**

Las preparaciones eran observadas con un microscopio Nikon Eclipse E800 con equipo de epifluorescencia con los filtros siguientes: filtro EX 510/60, DM 575 para visualizar la emisión del fluoróforo Alexa Fluor 594; filtro ultravioleta EX 330/380, DM 400 para observar la emisión del DAPI y filtro EX 450/90, DM 505 para poder observar la emisión del fluoróforo Alexa Fluor 488. Se comprobó que cada fluoróforo solo podía ser observado por medio de cada filtro específico impregnando un portaobjetos con una pequeña cantidad de CTb conjugada. El registro fotográfico de las preparaciones se realizó mediante una cámara digital Nikon acoplada al microscopio y las fotografías fueron posteriormente procesadas mediante el programa Adobe Photoshop CS3.

## **7. CUANTIFICACIÓN Y UBICACIÓN DE LAS NEURONAS TRAZADAS**

El trazador que había sido captado por los terminales sinápticos y transportado retrógradamente hasta el soma de las neuronas, se observaba en el microscopio como un depósito granulado en el citoplasma de las mismas. Para la contabilización de las neuronas, desarrollamos un método propio (Pascual-Font et al., 2011), basado en el descrito previamente por McHanwell y Biscoe (1981ab), que consiste en considerar para el recuento aquellas neuronas en las que se identifica el nucleolo. Cada neurona trazada era observada, con el filtro adecuado a su trazador, individualmente a 400 aumentos, cambiando el filtro de posición para visualizar la fluorescencia azul emitida por el DAPI identificábamos, o no, el nucleolo. Cuando este orgánulo era identificado, la neurona era considerada como tal y por lo tanto quedaba cuantificada y registrada. Si, por el contrario, no se identificaba el nucleolo, considerábamos que lo que estábamos observando era la sección de una neurona que no incluía el nucleolo y, por lo tanto, no se consideraba para la cuantificación. Con esta

metodología evitábamos la posibilidad de contar dos veces la misma neurona al quedar seccionada en dos cortes consecutivos, dado que la probabilidad de que el nucleolo también quedara seccionado es suficientemente pequeña como para no influir de manera significativa en el recuento total de neuronas. En todos los casos, el recuento de las neuronas fue realizado por dos observadores independientes.

Como guía para identificar las estructuras del tronco del encéfalo se ha utilizado el atlas publicado por Paxinos y Watson (2005). La determinación de la posición de las neuronas trazadas en el eje rostrocaudal fue establecida con respecto al óbex. No obstante, al seccionar el tronco del encéfalo, es imposible orientar la pieza con la precisión suficiente para obtener secciones perfectamente transversales. Este inconveniente técnico se elimina mediante un factor que corrige la posición con respecto al óbex de las estructuras ubicadas a cada lado del plano sagital del corte. Para ello se identificó el origen aparente de ambos nervios vestibulococleares, ya que resultaba una referencia válida para determinar la bondad de la orientación del plano de sección. De este modo, cuando se observaba el origen aparente de los dos nervios vestibulococleares en la misma sección, se asumía que la sección era perfectamente transversal, mientras que de no ser así se registraba la distancia apreciada entre ambos orígenes aparentes para proceder a corregir la posición relativa de las neuronas identificadas según la siguiente ecuación:

$$\text{Distancia real al óbex} = \text{distancia medida al óbex} \pm [(V1 + V2)/2]$$

V1. Distancia al óbex del origen del nervio vestibulococlear que aparece en primer lugar (el más caudal de los dos).

V2. Distancia al óbex del origen del nervio vestibulococlear que aparece en segundo lugar (el más craneal de los dos).

Suma o resta del valor de compensación  $\pm [(V1-V2)/2]$ : Se suma cuando la columna de neuronas trazadas son contralaterales al nervio vestibulococlear más caudal y se resta cuando dicha columna es ipsilateral.

En algunos experimentos de inyección de los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo se localizaron neuronas trazadas fuera del núcleo ambiguo. En cinco casos la posición de las neuronas, próximas al núcleo ambiguo, y el tamaño de las mismas, similar a las del resto del núcleo, nos hizo considerarlas como neuronas motoras laríngeas cuyo cuerpo neuronal se localizaba fuera de los límites generales del núcleo ambiguo. Muy raramente, se identificaron otras neuronas, situadas fuera del núcleo ambiguo y con un tamaño muy

diferente al resto de la población trazada, que también fueron registradas e identificadas para intentar determinar la estructura que inervaban. En ningún caso estas excepciones han supuesto una dificultad o una matización para la interpretación de los resultados.

## **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en este trabajo serán mostrados en dos partes consecutivas. En primer lugar desarrollaremos los correspondientes a los animales del grupo control, es decir, los datos correspondientes a las neuronas trazadas mediante inyecciones en los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo manteniendo el nervio laríngeo recurrente intacto. Seguidamente, describiremos los resultados obtenidos al inyectar los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo en los animales en los que el nervio laríngeo recurrente izquierdo había sido lesionado por aplastamiento, considerando la incidencia que en los resultados han tenido los diferentes tiempos de supervivencia de los animales después de efectuada la lesión.

## **1. RESULTADOS EN LOS ANIMALES DEL GRUPO CONTROL**

En todos los animales estudiados el trazador fue siempre identificado en células localizadas en el núcleo ambiguo ipsilateral al músculo trazado. En ningún caso hemos localizado neuronas trazadas en el núcleo ambiguo contralateral al músculo inyectado. Tampoco se trazaron neuronas en el núcleo dorsal del vago, ni fibras en el tracto o núcleo solitario o en el núcleo espinal del trigémino.

Los resultados obtenidos con el trazador conjugado a AF488 o a AF594 son perfectamente superponibles, de modo que se ha usado indistintamente uno u otro conjugado para inyectar los dos músculos estudiados. Como control para valorar la posibilidad de contaminación de las estructuras adyacentes al lugar de inyección, en dos animales se depositó CTb-AF488 sobre la laringe sin manipular, obteniéndose 4 y 5 neuronas trazadas, respectivamente. Ninguna de ellas estaba localizada en el núcleo ambiguo, por lo que consideramos que son mínimas las posibilidades de trazado espurio de neuronas que inervan estructuras circundantes a los músculos cuya inervación queremos analizar.

### **1.1 Inyecciones de CTb en el músculo cricoaritenideo posterior**

El acceso de este músculo requiere rotar ligeramente la laringe para poder observar el sitio de inyección. Se puso especial cuidado en no contaminar con el trazador la musculatura del esófago y los músculos constrictores de la faringe, ya que estas estructuras están inervadas

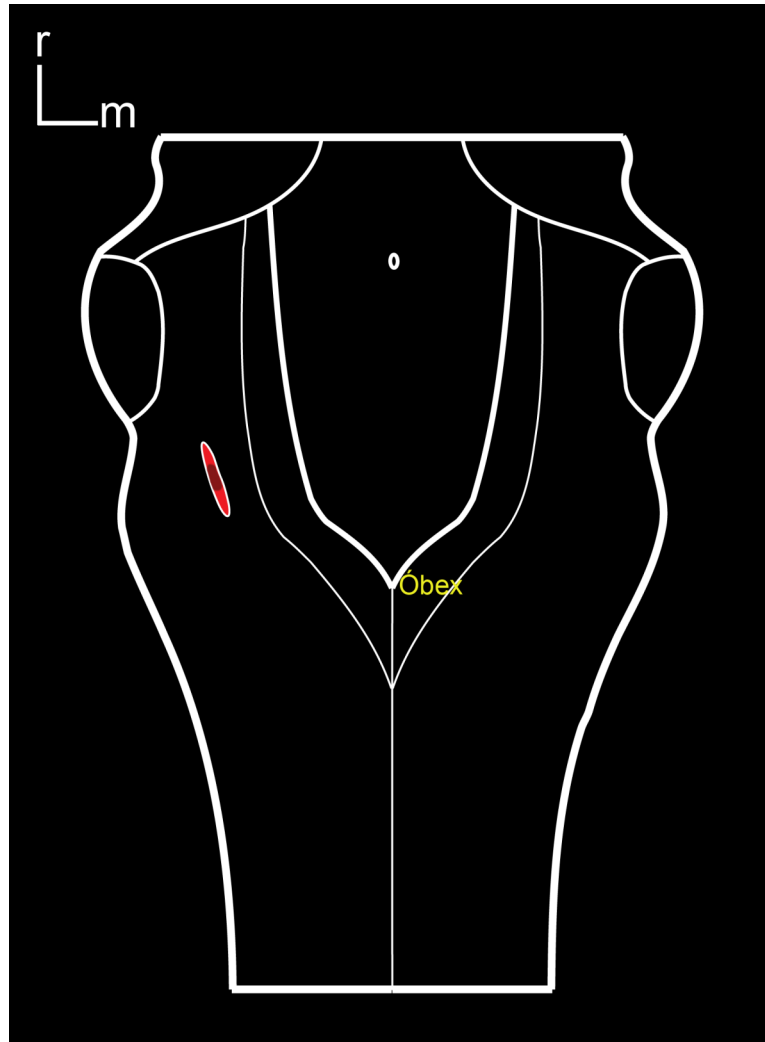
por neuronas localizadas en el núcleo ambiguo (Wyke y Kirchner, 1976; Bieger y Hopkins, 1987).

### 1.1.1 Localización de las neuronas trazadas

Todas las neuronas trazadas se localizan en la formación laxa del núcleo ambiguo, en una única población, aunque no homogénea, y distribuidas en una columna rostrocaudal rostral al óbex comprendida entre los  $910 \pm 150 \mu\text{m}$  y los  $1930 \pm 245 \mu\text{m}$ . Por otra parte, la mitad de las neuronas trazadas se encuentra concentrada en un segmento de  $350 \mu\text{m}$  de longitud, entre  $1175 \pm 215 \mu\text{m}$  y los  $1535 \pm 200 \mu\text{m}$ . La mediana de la distribución se encuentra en la mitad de la columna ( $1365 \pm 175 \mu\text{m}$ ). En la tabla 6 aparecen resumidos los resultados obtenidos con respecto a la posición y al número de neuronas trazadas desde este músculo, y en la figura 10 se muestra un esquema que representa la posición que ocupan estas neuronas en la médula oblongada.

Número neuronas trazadas	Región distribución ( $\mu\text{m}$ )	Región de mayor concentración ( $\mu\text{m}$ )	Mediana ( $\mu\text{m}$ )
$41 \pm 14$	$910 \pm 150 / 1930 \pm 245$	$1175 \pm 215 / 1535 \pm 200$	$1365 \pm 175$
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica n = 5			

**Tabla 6.** Resumen de los resultados obtenidos con el trazado desde el músculo cricoaritenoides posterior en los animales del grupo control.



**Figura 10.** Esquema de una visión dorsal del tronco del encéfalo. La región de distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior está en la médula oblongada representada en color rojo. El color más oscuro representa la región donde están localizadas el 50% de las neuronas trazadas.

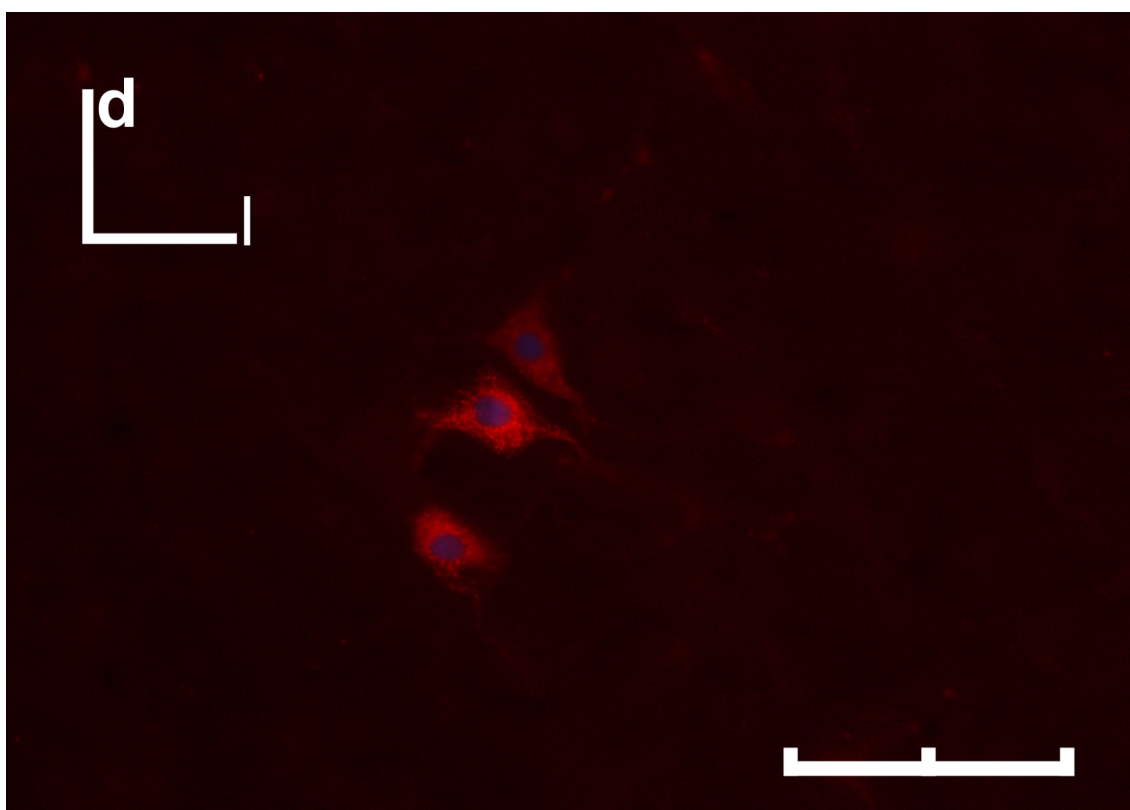
### 1.1.2 Número de neuronas trazadas

El número de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior osciló entre 20 y 51. La media del número de neuronas de todos los experimentos realizados fue de  $41 \pm 14$  (tabla 6).

### 1.1.3 Morfología de las neuronas trazadas

La mayoría de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior mostraba una morfología multipolar (figura 11). Menos del 2% de las neuronas analizadas presentaron morfología fusiforme.





**Figura 11.** Microfotografía que muestra varias neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior tras inyectar CTb-AF594. Escala: 100  $\mu$ m.

## 1.2 Inyecciones de CTb en el músculo tiroaritenoides

El trazado desde el músculo tiroaritenoides resultaba técnicamente más sencillo que desde el músculo cricoaritenoides posterior. Las únicas dificultades consistían en limpiar el área de trazado del pequeño sangrado de los vasos que se produce en la apertura de la ventana y en evitar inyectar accidentalmente en el músculo cricoaritenoides lateral, debido a la proximidad de éste músculo al tiroaritenoides.

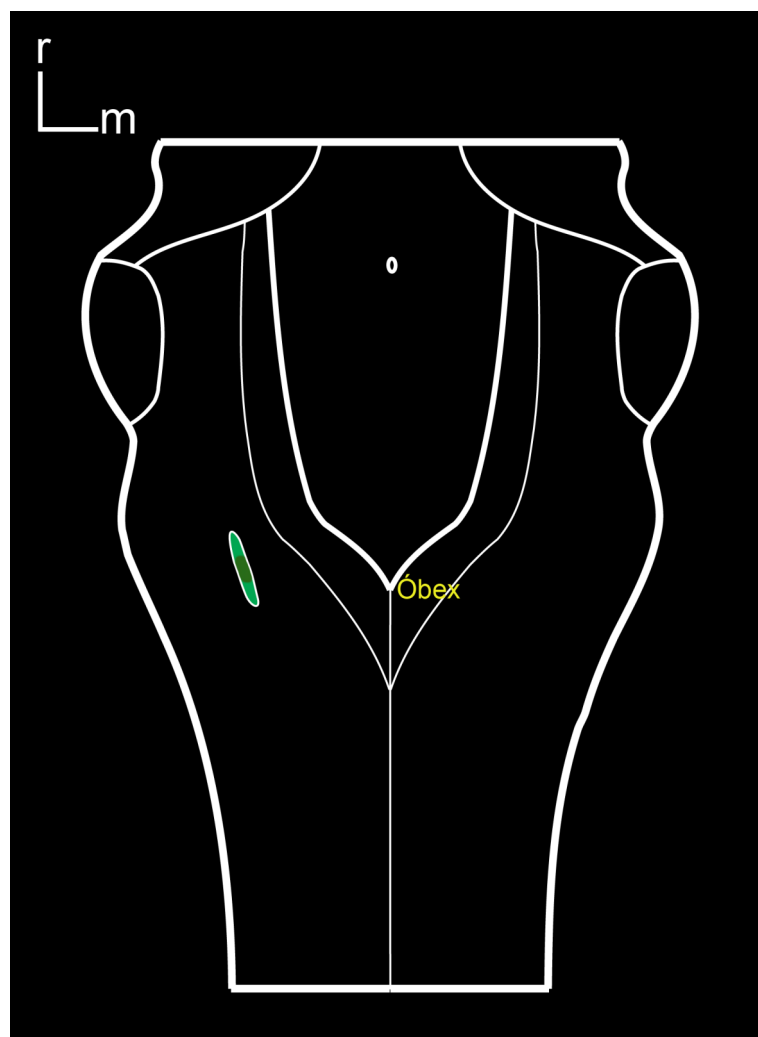
### 1.2.1 Localización de las neuronas trazadas

Las motoneuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides, al igual que en el trazado del músculo cricoaritenoides posterior, están distribuidas en una columna rostrocaudal no homogénea localizada en la formación laxa del núcleo ambiguo. Esta columna está situada caudalmente a la población de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior y abarca desde los  $280 \pm 180$   $\mu$ m caudal al óbex hasta los  $750 \pm 170$   $\mu$ m rostral al óbex. El 50%

del total de las neuronas trazadas se encuentran concentradas en 375  $\mu\text{m}$  de longitud, entre los  $30 \pm 130 \mu\text{m}$  y los  $405 \pm 130 \mu\text{m}$ . La mediana se encontraba situada centrada en la distribución,  $250 \pm 70 \mu\text{m}$  rostral al óbex (tabla 7). La figura 12 muestra un esquema que representa la posición que ocupan estas neuronas en la médula oblongada.

Número neuronas trazadas	Región distribución ( $\mu\text{m}$ )	Región de mayor concentración ( $\mu\text{m}$ )	Mediana ( $\mu\text{m}$ )
$31 \pm 14$	$-280 \pm 180 / 750 \pm 170$	$30 \pm 130 / 405 \pm 130$	$250 \pm 70$
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica n = 5			

**Tabla 7.** Resumen del trazado desde el músculo tiroaritenoides en el grupo control.



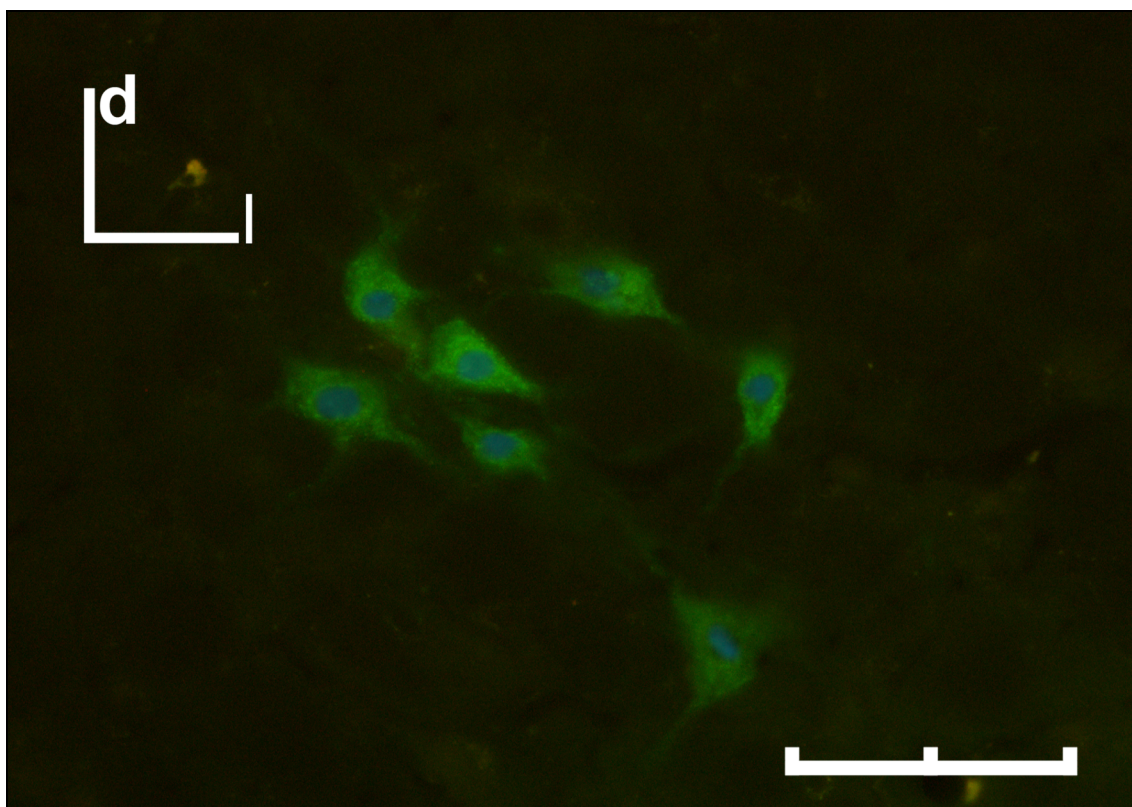
**Figura 12.** Esquema de una visión dorsal del tronco del encéfalo. La región de distribución de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides en la médula oblongada está representada en color verde. El color más oscuro representa la región donde están localizadas el 50% de las neuronas.

### 1.2.2 Número de neuronas trazadas

El número de neuronas trazadas después de la inyección de toxina colérica en el músculo tiroaritenoso se encontraba, al igual que en el músculo cricoaritenoso posterior, comprendido entre 20 y 51, aunque con una media de  $31 \pm 14$  (tabla 7).

### 1.2.3 Morfología de las neuronas trazadas

La morfología de todas las neuronas trazadas fue multipolar (figura 13), no identificándose neuronas de morfología fusiforme.



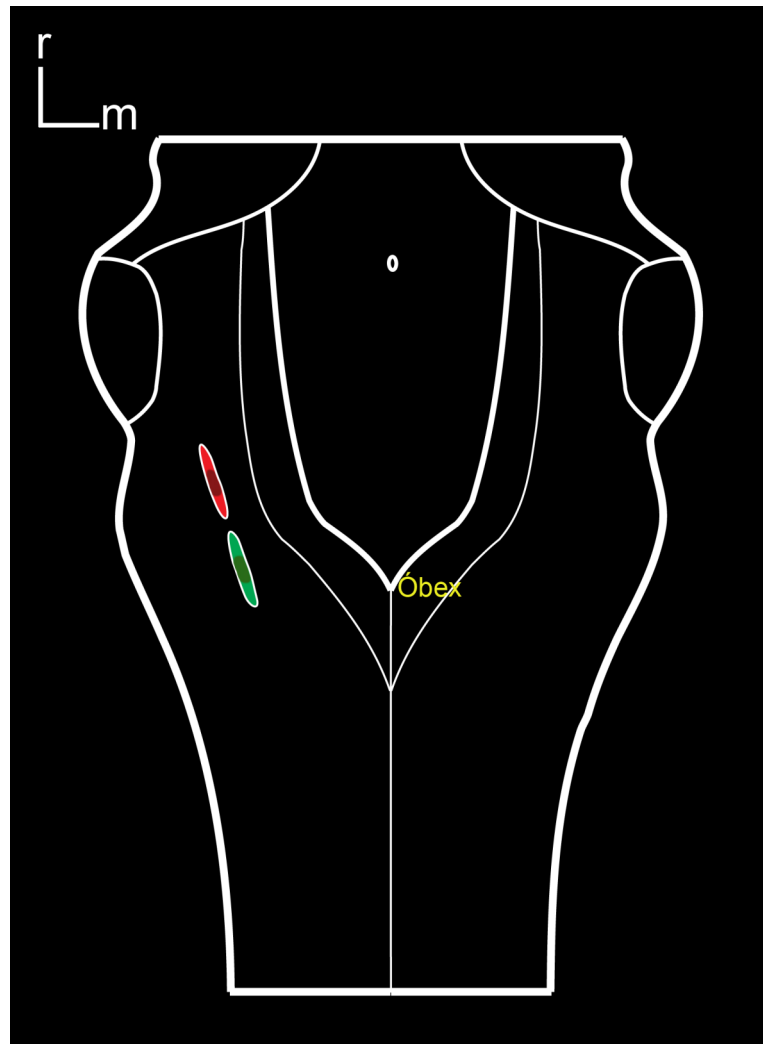
**Figura 13.** Microfotografía que muestra varias neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoso tras inyectar CTb-AF488. La morfología observada es multipolar. Escala: 100  $\mu$ m.

### 1.3 Trazado desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides

Las poblaciones neuronales de los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides son contiguas, solapándose en algunos casos mínimamente en un área muy pequeña. En 3 de los 5 animales se encontró un pequeño territorio de  $65 \pm 30 \mu\text{m}$  de longitud cráneo-caudal en el que solo se localizaron  $3 \pm 2$  neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior y  $3 \pm 1$  neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides, lo que representa aproximadamente el 5% de las neuronas de la población total del trazado de sendos músculos (tabla 8). En los dos animales restantes, las poblaciones de neuronas trazadas desde ambos músculos se hallaban separadas por una distancia en sentido cráneo-caudal de  $200 \mu\text{m}$  en un caso y  $600 \mu\text{m}$  en otro. En la figura 14 se representan las poblaciones neuronales trazadas desde los dos músculos.

Animal	Inicio de la región de solapamiento ( $\mu\text{m}$ )	Fin de la región de solapamiento ( $\mu\text{m}$ )	Distancia ( $\mu\text{m}$ )	Neuronas trazadas desde TA	Neuronas trazadas desde CAP
TP3	-	-	-	-	-
TP4	800	900	100	3	5
TP5	800	850	50	2	2
TP6	-	-	-	-	-
TP7	800	850		3	1
<b>Media</b>	<b>800</b>	<b>865</b>	<b>65</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Desv. tip.</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

**Tabla 8.** Resumen de los resultados cuantitativos del área de solapamiento de las poblaciones neuronales de los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides.



**Figura 14.** Esquema de una visión dorsal del tronco del encéfalo. La región de distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoidio posterior está en la médula oblongada representada en color rojo y la región distribución de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoidio está representada en color verde. El color más oscuro representa la región donde están localizadas el 50% de las neuronas trazadas.

## 2. GRUPOS EXPERIMENTALES

En todos los animales de este grupo las neuronas trazadas se hallan en el núcleo ambiguo ipsilateral. No obstante, los resultados de la topografía de las neuronas trazadas en los diferentes grupos son muy diversos, variando considerablemente la posición y el número de neuronas trazadas de unos animales a otros. Desde el punto de vista funcional, la motilidad del pliegue vocal izquierdo en los animales analizados varía en función del tiempo de supervivencia de los diferentes grupos experimentales.

## 2.1 Motilidad de los pliegues vocales

En la mayoría de los animales en los que procedimos a lesionar el nervio laríngeo recurrente se ha podido realizar un seguimiento laringoscópico del movimiento de los pliegues vocales a lo largo del periodo de supervivencia, excepto en un 25% de los cuales no pudimos por diversos motivos (tabla 9). En la mayoría de los casos fue debido a que, en el momento de introducir el laringoscopio por la boca, la faringe del animal estaba llena de comida, lo que obligaba a abortar la laringoscopia por el riesgo de aspiración. En segundo lugar, diversos animales eran especialmente sensibles a la introducción del laringoscopio por la vía aérea, ya que presentaban un reflejo del vómito muy acusado. Los animales de los que no se tienen datos del movimiento de los pliegues vocales están distribuidos en todos los grupos experimentales (tabla 9).

Posición de los pliegues vocales laríngeos	Ángulo abducción (en °)	Ángulo aducción (en °)	Número de animales
<b>Medial</b>	15,08 ± 5,40 (10,12 – 23,04)	2,21 ± 0,84 (0 – 3,20)	19
<b>Paramediana</b>	23,55 ± 4,35 (15,83 – 28,18)	8,91 ± 2,67 (5,60 – 13,56)	18
<b>Abierta</b>	≥ 30 *	≥ 15 *	0
<b>No observado</b>			12
<b>Total</b>			49
Los datos se expresan como media ± desviación típica			
* Estimación			

**Tabla 9.** Resumen de las observaciones de los pliegues vocales después de haber sido realizada la lesión del nervio laríngeo recurrente. Entre paréntesis se representa el intervalo entre el menor y el mayor ángulo.

Una semana después de la lesión del nervio laríngeo recurrente todos los animales tenían el pliegue vocal izquierdo paralizado, bien en posición medial, bien en posición paramedial. Todos los animales mantienen, en la exploración previa al sacrificio, el pliegue vocal paralizado en la misma posición que tenía tras la lesión del nervio, con una excepción en la que la posición del pliegue paralizado pasó de medial a paramedial (tabla 10, figura 14).

Animal	Periodo de supervivencia	Estado del pliegue vocal tras la lesión	Estado del pliegue vocal antes del sacrificio
1-WC-1	1 semana	Paralizado medial	Paralizado medial
1-WC-2	1 semana	Paralizado medial	Paralizado medial
1-WC-3	1 semana	No observado	Paralizado paramedial
1-WC-4	1 semana	Paralizado medial	Paralizado paramedial
1-WC-7	1 semana	Paralizado paramedial	Paralizado paramedial
1-WC-8	1 semana	Paralizado paramedial	Paralizado paramedial

**Tabla 10.** Resultados de la observación de los pliegues vocales en el grupo de animales de una semana de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

A partir de la segunda semana de supervivencia ya comenzó a observarse en algunos animales una recuperación de la movilidad del pliegue vocal paralizado. Así, en dos animales ya se apreciaban movimientos de aducción completa y de abducción casi completa; en tres ratas había movimientos limitados y descoordinados y, finalmente, en cuatro ejemplares los pliegues continuaban inmóviles. En uno de estos animales con el pliegue paralizado, se había producido un cambio de la posición de parálisis medial original a una posición paramedial (Tabla 11).

Animal	Periodo de supervivencia	Estado del pliegue vocal tras la lesión	Estado del pliegue vocal antes del sacrificio
CRUSH12	2 semanas	No observado	Paralizado medial
CRUSH13	2 semanas	No observado	Paralizado medial
CRUSH14	2 semanas	No observado	+
CRUSH16	2 semanas	No observado	Paralizado paramedial
15-DC-1	2 semanas	Paralizado medial	+
15-DC-2	2 semanas	Paralizado paramedial	+
15-DC-3	2 semanas	Paralizado medial	Paralizado paramedial
15-DC-4	2 semanas	Paralizado medial	++
15-DC-5	2 semanas	Paralizado paramedial	++
+. Movimientos ligeros			
++. Movimientos de abducción y aducción claros y próximos a la normalidad			

**Tabla 11.** Resultados de la observación de los pliegues vocales en el grupo de animales de dos semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

En el grupo de cuatro semanas de supervivencia no fue posible realizar la laringoscopia ni después de la lesión del nervio ni antes de la eutanasia en dos animales. En los animales restantes se observó movimiento en los pliegues vocales de tres de ellos. No obstante, en uno

de los tres el movimiento del pliegue vocal izquierdo trazaba un arco más reducido que el pliegue vocal derecho (tabla 12).

Animal	Periodo de supervivencia	Estado del pliegue vocal tras la lesión	Estado del pliegue vocal antes del sacrificio
CRUSH1	4 semanas	No observado	No observado
CRUSH2	4 semanas	No observado	No observado
CRUSH3	4 semanas	No observado	Paralizado paramedial
CRUSH5	4 semanas	No observado	++
CRUSH15	4 semanas	No observado	+
1-MC-1	4 semanas	Paralizado paramedial	++
+. Movimientos ligeros			
++. Movimientos de abducción y aducción claros y próximos a la normalidad			

**Tabla 12.** Resultados de la observación de los pliegues vocales en el grupo de animales de cuatro semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

Cuatro de los animales del grupo de seis semanas de supervivencia fueron sacrificados una semana más tarde de lo planificado inicialmente. En cualquier caso, los resultados en este grupo de animales no difieren mucho de los del grupo de cuatro semanas, y tres de los animales habían recuperado buena parte de la motilidad en sus pliegues vocales izquierdos (tabla 13).

Animal	Periodo de supervivencia	Estado del pliegue vocal tras la lesión	Estado del pliegue vocal antes del sacrificio
6-WC-1	7 semanas	Paralizado medial	++
6-WC-2	7 semanas	Paralizado medial	++
6-WC-3	7 semanas	Paralizado medial	No observado
6-WC-4	7 semanas	Paralizado paramedial	++
6-WC-5	6 semanas	Paralizado paramedial	Paralizado paramedial
6-WC-6	6 semanas	Paralizado paramedial	Paralizado medial
6-WC-7	6 semanas	Paralizado paramedial	Paralizado paramedial
++. Movimientos de abducción y aducción claros y próximos a la normalidad			

**Tabla 13.** Resultados de la observación de los pliegues vocales en el grupo de animales con seis y siete semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

De los seis animales con ocho semanas de supervivencia en los que pudo realizarse la laringoscopia, cuatro presentaban movimientos completos de abducción y aducción. En uno de los animales con el pliegue paralizado la posición del pliegue vocal había cambiado la posición del mismo (tabla 14).



Animal	Periodo de supervivencia	Estado del pliegue vocal tras la lesión	Estado del pliegue vocal antes del sacrificio
CRUSH 7	8 semanas	No observado	++
CRUSH 8	8 semanas	No observado	No observado
CRUSH 11	8 semanas	No observado	++
2-MC-1	8 semanas	Paralizado medial	++
2-MC-2	8 semanas	Paralizado paramedial	++
2-MC-3	8 semanas	Paralizado paramedial	Paralizado paramedial
2-MC-4	8 semanas	Paralizado paramedial	++
2-MC-5	8 semanas	Paralizado medial	Paralizado paramedial
++. Movimientos de abducción y aducción claros y próximos a la normalidad			

**Tabla 14.** Resultados de la observación de los pliegues vocales en el grupo de animales con ocho semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

En los grupos de doce y dieciséis semanas de supervivencia post-lesión los resultados de la observación de los pliegues vocales fueron bastante similares, y cinco y seis animales, respectivamente, mostraron buena motilidad del pliegue vocal izquierdo frente a un único animal en cada caso con parálisis completa del pliegue (tablas 15 y 16).

Animal	Periodo de supervivencia	Estado del pliegue vocal tras la lesión	Estado del pliegue vocal antes del sacrificio
3-MC-2	12 semanas	Paralizado medial	Paralizado paramedial
3-MC-3	12 semanas	Paralizado medial	++
3-MC-4	12 semanas	Paralizado medial	No observado
3-MC-5	12 semanas	Paralizado paramedial	++
3-MC-6	12 semanas	Paralizado medial	++
3-MC-7	12 semanas	Paralizado medial	++
3-MC-8	12 semanas	Paralizado medial	++
++. Movimientos de abducción y aducción claros y próximos a la normalidad			

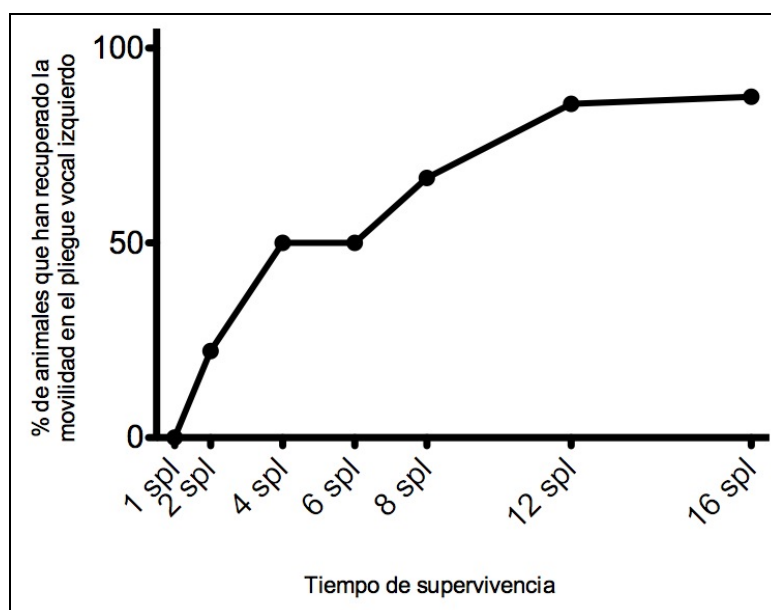
**Tabla 15.** Resultados de la observación de los pliegues vocales realizados en el grupo de animales con doce semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

Animal	Periodo de supervivencia	Estado del pliegue vocal tras la lesión	Estado del pliegue vocal antes del sacrificio
4-MC-1	16 semanas	Paralizado medial	++
4-MC-2	16 semanas	Paralizado paramedial	++
4-MC-4	16 semanas	Paralizado paramedial	++
4-MC-5	16 semanas	Paralizado paramedial	++
4-MC-6	16 semanas	Paralizado medial	Paralizado medial
4-MC-7	16 semanas	Paralizado medial	++
4-MC-8	16 semanas	Paralizado medial	++

++. Movimientos de abducción y aducción claros y próximos a la normalidad

**Tabla 16.** Resultados de la observación de los pliegues vocales realizados en el grupo de animales con dieciséis semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

En resumen, analizando los resultados en función del tiempo transcurrido desde la lesión del nervio por aplastamiento se observa que existe una recuperación progresiva de la movilidad de los pliegues vocales. A partir de las 12 semanas de la lesión, prácticamente todos los animales han recuperado la movilidad del pliegue vocal izquierdo (figura 15).



**Figura 15.** Evolución de la movilidad de los pliegues vocales desde una hasta dieciséis semanas después de la lesión. En el eje de abscisas se representan los grupos experimentales según el periodo de supervivencia. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de animales que ha recuperado la movilidad en el pliegue vocal izquierdo.

Por otra parte, en cuatro de los animales que en el segundo análisis mantenían paralizado el pliegue vocal izquierdo se observó un cambio de posición del mismo desde medial a paramedial y en uno de paramedial a medial.

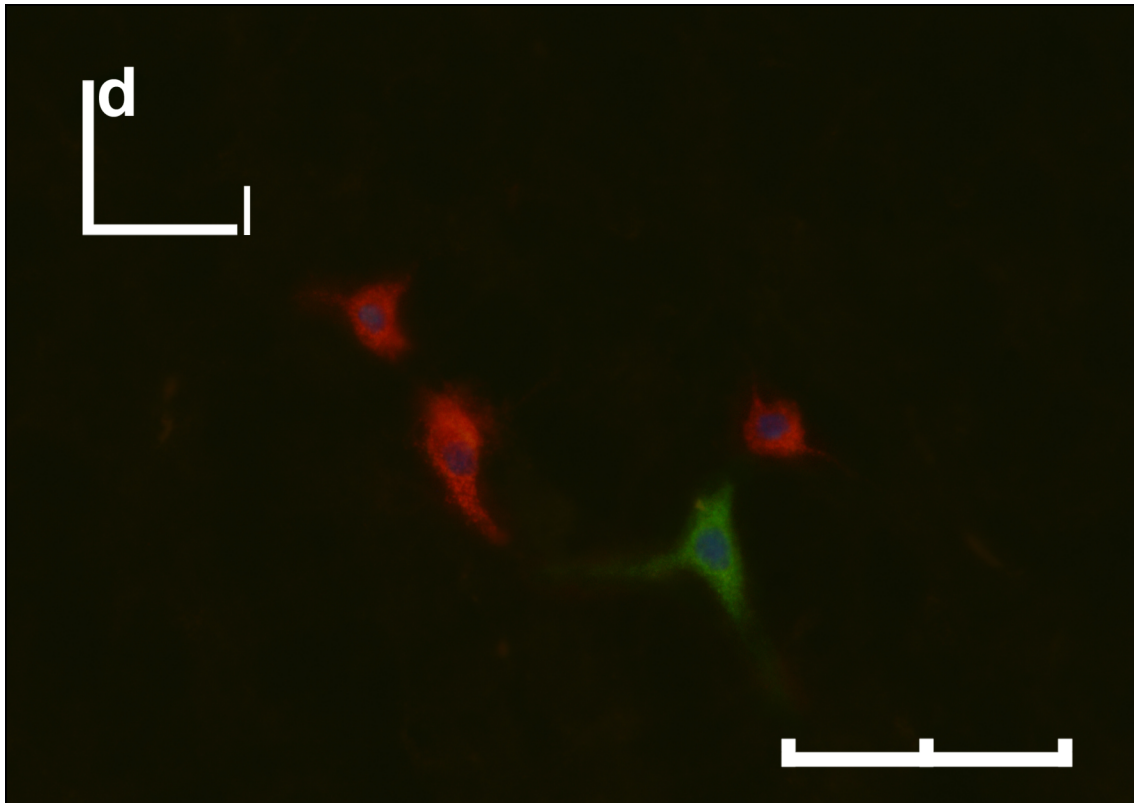
## 2.2 Localización de las neuronas trazadas

El mapa somatotópico de las neuronas trazadas, desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides, en los animales con el nervio laríngeo recurrente lesionado está completamente alterado, para todos los tiempos estudiados, con respecto al obtenido en los animales del grupo control. Además, hemos observado una gran variabilidad en la posición de las neuronas entre los animales que constituyen cada grupo experimental y que va a quedar reflejada en la elevada desviación típica de los grupos experimentales en comparación con la obtenida en el grupo control.

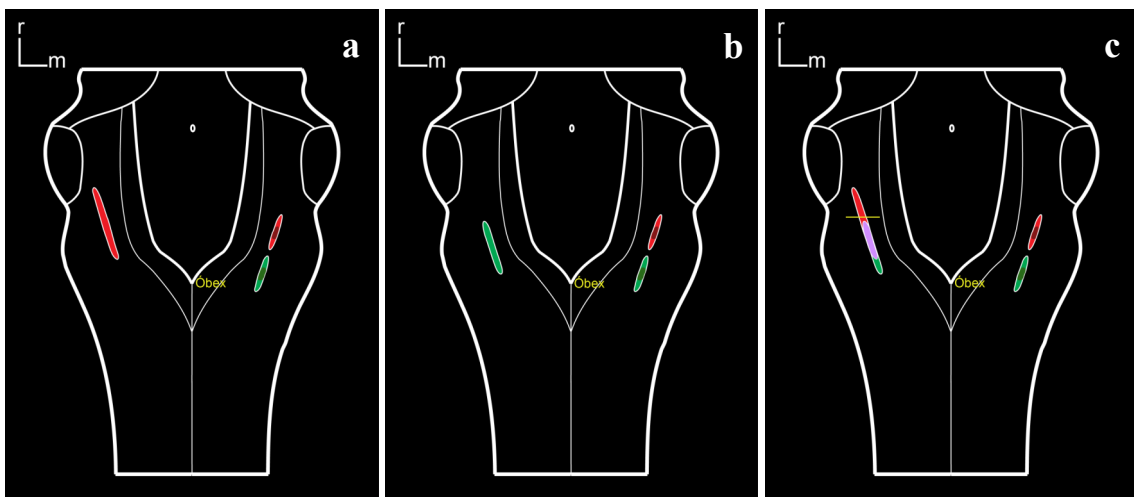
En los animales con una semana de supervivencia las motoneuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior están localizadas rostrales al óbex entre  $690 \pm 240$  y  $2960 \pm 280 \mu\text{m}$ , posición más rostral que en los animales control (tabla 17). Las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides se ubican, también rostrales al óbex, entre  $200 \pm 375$  y  $1865 \pm 560 \mu\text{m}$ , en una posición rostral con respecto al control. Para las poblaciones neuronales de ambos músculos, y en contraste muy marcado con las poblaciones control, no se puede definir ninguna región donde las neuronas se agrupen más densamente pero sí que se define un amplio territorio de solapamiento entre ambas ( $1140 \pm 265 \mu\text{m}$  de longitud) (figuras 16, 17 y 18).

Estado del pliegue vocal	Posición del CAP (en $\mu\text{m}$ )	Posición del TA (en $\mu\text{m}$ )	Región de solapamiento ( $\mu\text{m}$ )
0	$690 \pm 240 / 2960 \pm 280$	$200 \pm 375 / 1865 \pm 560$	$1140 \pm 265$
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica. El punto de referencia es el óbex. CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 6)			

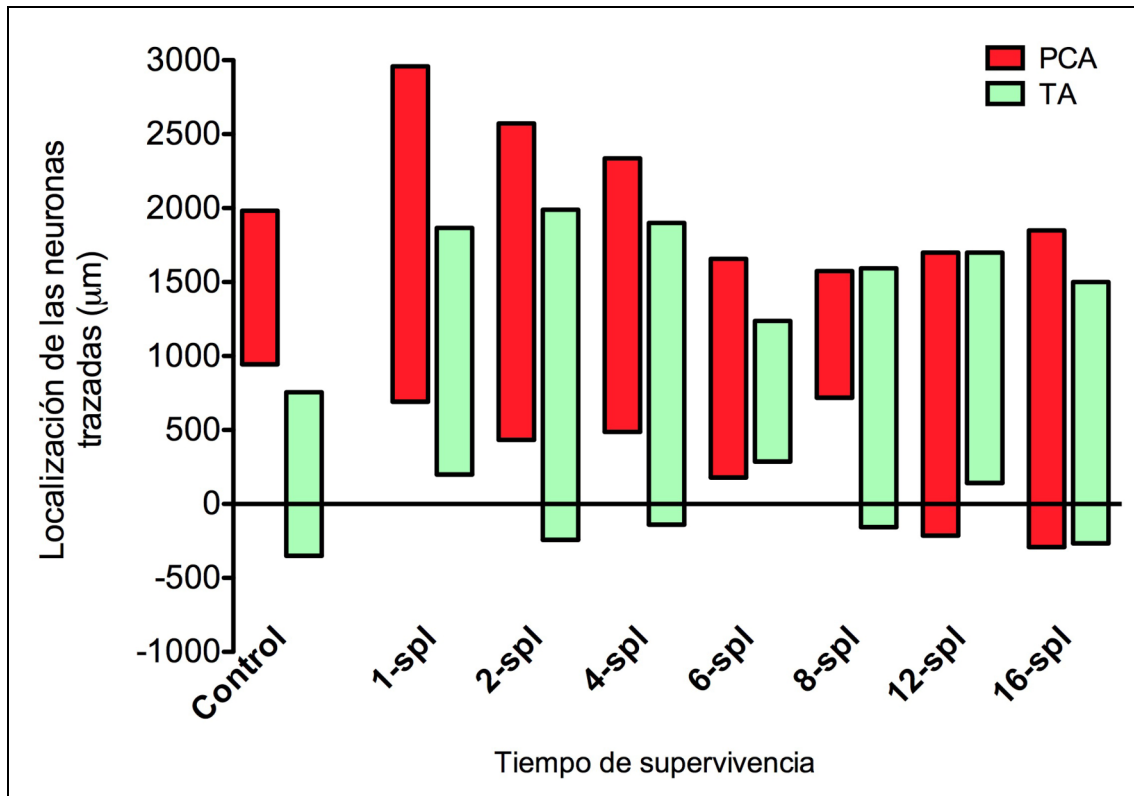
**Tabla 17.** Localización de las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides en el grupo con una semana de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.



**Figura 16.** Fotografía de una sección donde se muestran las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior (rojo) y las trazadas desde el músculo tiroaritenoides (verde). A diferencia del grupo control, el solapamiento de estas dos poblaciones ocurre en todos los animales estudiados. Escala: 100  $\mu$ m.



**Figura 17.** Diagramas esquemáticos de una visión dorsal del tronco del encéfalo que representan la distribución de las neuronas trazadas una semana después de la lesión en el nervio laríngeo recurrente desde los músculos cricoaritenoides posterior (a, color rojo) y tiroaritenoides (b, color verde). La imagen (c) representa la superposición de ambas poblaciones, mostrando en color violeta la región de solapamiento. En el lado derecho aparecen representadas las neuronas trazadas en el grupo control y la barra amarilla indica el límite rostral donde se han identificado neuronas trazadas en el grupo control.



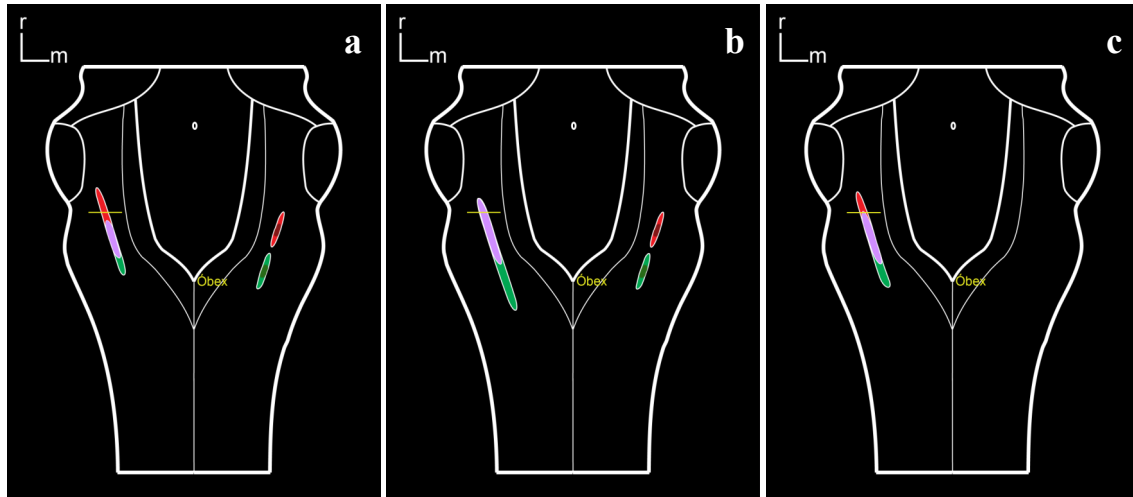
**Figura 18.** Diagrama que muestra la longitud de la columna rostrocaudal del núcleo ambiguo en la que se distribuyen las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior (rojo, CAP) y tiroaritenoides (verde, TA) tanto en el grupo control como en los grupos experimentales (spl: semanas post-lesión).

En el grupo de dos semanas de supervivencia después de la lesión, la posición de las neuronas trazadas era similar a las del grupo de una semana post-lesión aunque se observaban menos neuronas situadas rostralmente, especialmente para las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior en los animales en los que el pliegue vocal afectado había recuperado la motilidad (tabla 18; figura 18 y 19).

Estado del pliegue vocal	Posición del CAP (en $\mu\text{m}$ )	Posición del TA (en $\mu\text{m}$ )	Región de solapamiento ( $\mu\text{m}$ )
0 y +	$615 \pm 960 / 2710 \pm 385$	$110 \pm 815 / 1735 \pm 930$	1600 *
++	$400 \pm 70 / 2375 \pm 35$	$-950 \pm 285 / 2375 \pm 105$	$1950 \pm 0$
Todos	$435 \pm 835 / 2570 \pm 355$	$-240 \pm 845 / 1990 \pm 745$	$1835 \pm 200$

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación típica. El punto de referencia es el óbex.  
 CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior  
 TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides  
 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 4)  
 +. Animales con movimiento mínimo en el pliegue vocal (n = 3)  
 ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos a los del control (n = 2)  
 \* Resultados obtenidos de un animal

**Tabla 18.** Localización de las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides en el grupo con dos semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

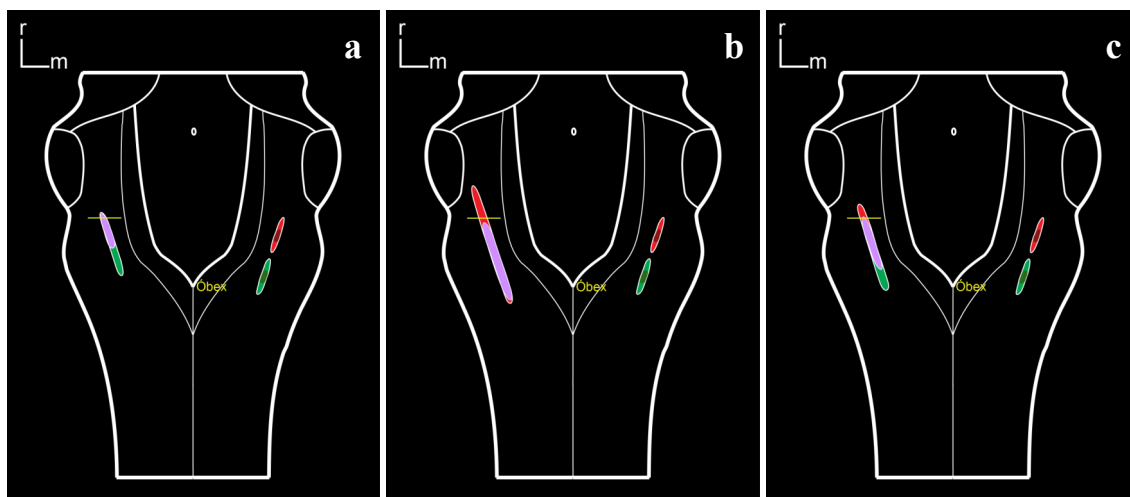


**Figura 19.** Diagramas esquemáticos de una visión dorsal del tronco del encéfalo que representan la distribución de las neuronas trazadas dos semanas después de la lesión en el nervio laríngeo recurrente desde los músculos cricoaritenideo posterior (color rojo) y tiroaritenideo (color verde). En color violeta se representa la superposición de ambas poblaciones, mostrando la región de solapamiento. Imagen **a**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales con el pliegue vocal paralizado. Imagen **b**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales que han recuperado la movilidad en el pliegue vocal. Obsérvese que la distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior solapa con la región de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo. Imagen **c**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de todos los animales que componen el grupo. En el lado derecho aparecen representadas las neuronas trazadas en el grupo control y la barra amarilla indica el límite rostral donde se han identificado neuronas trazadas en el grupo control.

En el grupo de cuatro semanas de supervivencia los resultados son muy semejantes a los del grupo de dos semanas (tabla 19; figura 18 y 20).

Estado del pliegue vocal	Posición del CAP (en $\mu\text{m}$ )	Posición del TA (en $\mu\text{m}$ )	Región de solapamiento ( $\mu\text{m}$ )
0 y +	1100 / 2150 *	275 ( $\pm$ 1165) / 2050 ( $\pm$ 920)	1050 *
++	-550 / 2950 *	-450 ( $\pm$ 140) / 1850 ( $\pm$ 0)	2400 *
Todos	490 $\pm$ 915 / 2340 $\pm$ 415	-140 $\pm$ 700 / 1900 $\pm$ 485	1250 $\pm$ 1065
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica. El punto de referencia es el óbex. CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 1) +. Animales con movimiento mínimo en el pliegue vocal (n = 1) ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos a los del control (n = 2) * Resultados obtenidos de un animal Pliegue vocal no observado en 2 animales			

**Tabla 19.** Localización de las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo en el grupo con cuatro semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

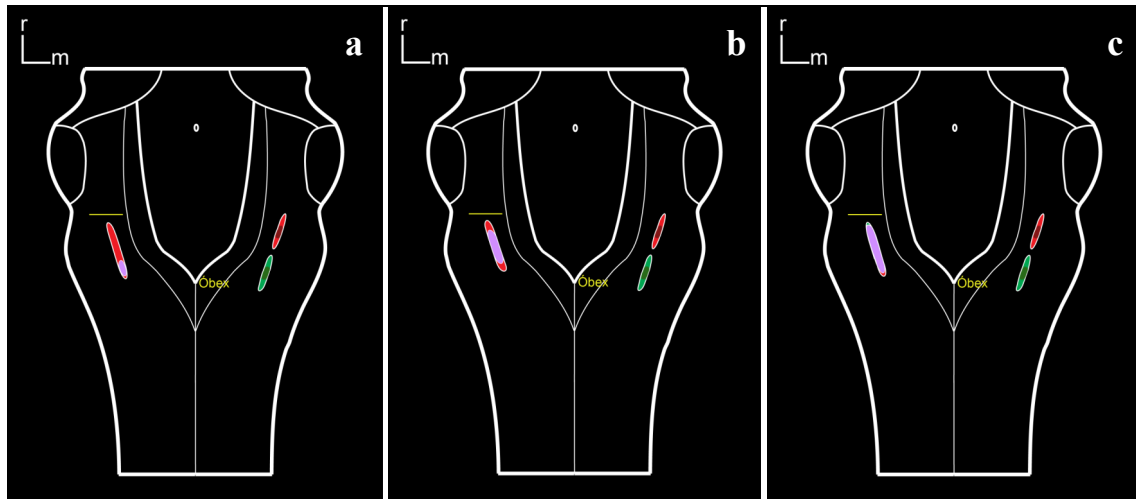


**Figura 20.** Diagramas esquemáticos de una visión dorsal del tronco del encéfalo que representan la distribución de las neuronas trazadas cuatro semanas después de la lesión en el nervio laríngeo recurrente desde los músculos cricoaritenoides posterior (color rojo) y tiroaritenoides (color verde). En color violeta se representa la superposición de ambas poblaciones, mostrando la región de solapamiento. Imagen **a**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales con el pliegue vocal paralizado. Imagen **b**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales que han recuperado la movilidad en el pliegue vocal. Obsérvese que la distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior solapa con la región de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides. Imagen **c**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de todos los animales que componen el grupo. En el lado derecho aparecen representadas las neuronas trazadas en el grupo control y la barra amarilla indica el límite rostral donde se han identificado neuronas trazadas en el grupo control.

En la sexta semana de supervivencia después de la lesión, las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior se ubican en una región dentro de los límites rostrales determinados para la población neuronal de este músculo en los controles. No obstante, tanto para las neuronas del cricoaritenoides posterior como para las del tiroaritenoides, las células trazadas están localizadas en una región de mayor extensión rostrocaudal que aquellas del grupo control (tabla 20; figura 18 y 21).

Estado del pliegue vocal	Posición del CAP (en $\mu\text{m}$ )	Posición del TA (en $\mu\text{m}$ )	Región de solapamiento ( $\mu\text{m}$ )
0 y +	$15 \pm 115 / 1700 \pm 1035$	$125 \pm 175 / 525 \pm 35$	$400 \pm 210$
++	$315 \pm 605 / 1750 \pm 260$	$550 / 1500 *$	$950 *$
Todos	$180 \pm 385 / 1655 \pm 640$	$290 \pm 230 / 1240 \pm 900$	$665 \pm 330$
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica. El punto de referencia es el óbex. CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 3) +. Animales con movimiento mínimo en el pliegue vocal ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos a los del control (n = 3) * Resultados obtenidos de un animal Pliegue vocal no observado en 1 animal			

**Tabla 20.** Localización de las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo en el grupo con seis semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.



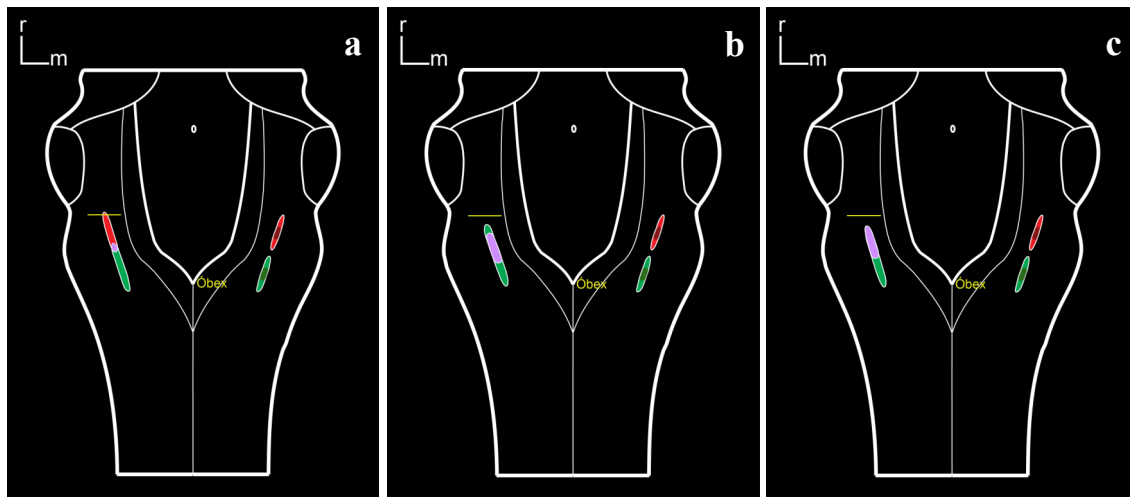
**Figura 21.** Diagramas esquemáticos de una visión dorsal del tronco del encéfalo que representan la distribución de las neuronas trazadas seis semanas después de la lesión en el nervio laríngeo recurrente desde los músculos cricoaritenideo posterior (color rojo) y tiroaritenideo (color verde). En color violeta se representa la superposición de ambas poblaciones, mostrando la región de solapamiento. Imagen **a**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales con el pliegue vocal paralizado. Imagen **b**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales que han recuperado la movilidad en el pliegue vocal. Obsérvese que la distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior solapa con la región de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo. Imagen **c**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de todos los animales que componen el grupo. En el lado derecho aparecen representadas las neuronas trazadas en el grupo control y la barra amarilla indica el límite rostral donde se han identificado neuronas trazadas en el grupo control.

En el grupo de ocho semanas de supervivencia continua la tendencia, iniciada a las seis semanas, por la que la extensión rostrocaudal de la columna de neuronas trazadas desde ambos músculos se va ajustando a la obtenida en el grupo control y, adicionalmente, ese territorio está ocupado indistintamente por neuronas que proyectan a uno u otro músculo sin conservar la secuencia somatotópica descrita en los controles (tabla 21; figura 18 y 22).



Estado del pliegue vocal	Posición del CAP (en $\mu\text{m}$ )	Posición del TA (en $\mu\text{m}$ )	Región de solapamiento ( $\mu\text{m}$ )
0 y +	$875 \pm 35 / 2100 \pm 1275$	$-250 \pm 495 / 1225 \pm 1380$	$1350 *$
++	$600 \pm 500 / 1400 \pm 920$	$-120 \pm 575 / 1740 \pm 335$	$815 \pm 125$
Todos	$720 \pm 355 / 1575 \pm 880$	$-155 \pm 515 / 1595 \pm 675$	$950 \pm 285$
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica. El punto de referencia es el óbex. CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 2) +. Animales con movimiento mínimo en el pliegue vocal ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos a los del control (n = 5) * Resultados obtenidos de un animal Pliegue vocal no observado en 1 animal			

**Tabla 21.** Localización de las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo en el grupo con ocho semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.



**Figura 22.** Diagramas esquemáticos de una visión dorsal del tronco del encéfalo que representan la distribución de las neuronas trazadas ocho semanas después de la lesión en el nervio laríngeo recurrente desde los músculos cricoaritenideo posterior (color rojo) y tiroaritenideo (color verde). En color violeta se representa la superposición de ambas poblaciones, mostrando la región de solapamiento. Imagen a: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales con el pliegue vocal paralizado. Imagen b: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales que han recuperado la movilidad en el pliegue vocal. Obsérvese que la distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior solapa con la región de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo. Imagen c: distribución de las neuronas trazadas obtenida de todos los animales que componen el grupo. En el lado derecho aparecen representadas las neuronas trazadas en el grupo control y la barra amarilla indica el límite rostral donde se han identificado neuronas trazadas en el grupo control.

Los resultados obtenidos en los grupos de doce y dieciséis semanas después de realizar la lesión del nervio laríngeo recurrente fueron muy similares. En los animales con el pliegue vocal aún paralizado, solo dos, las neuronas trazadas se encontraban muy dispersas, ocupando una gran extensión rostrocaudal en el núcleo ambiguo. En cuanto a los animales con la motilidad

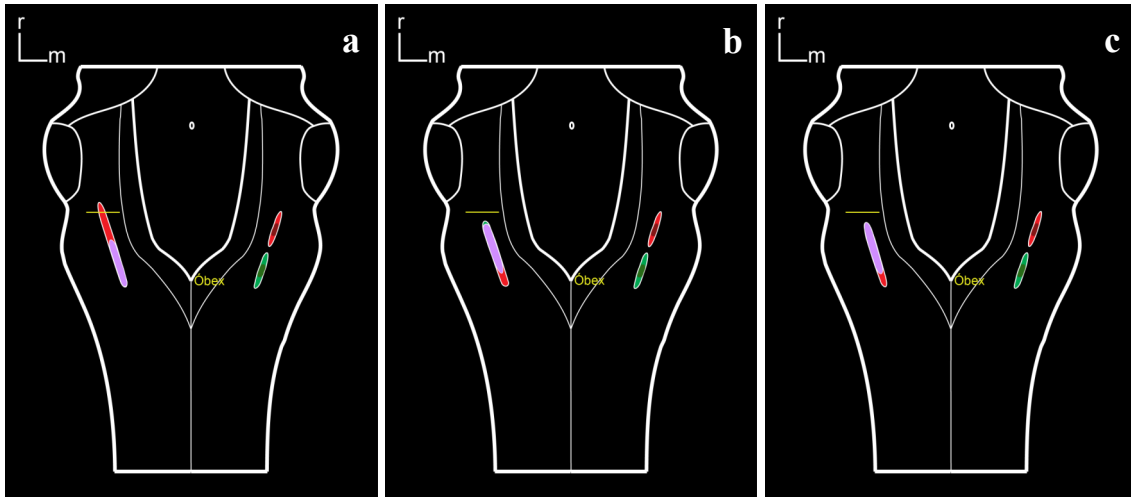
del pliegue vocal recuperada, las neuronas trazadas se distribuyen en una menor extensión rostrocaudal, pero solapando en gran parte de esa región, es decir, sin agruparse en función del músculo que inervan y confirmando la distribución apuntada en los animales con seis y ocho semana de supervivencia (tablas 22 y 23; figuras 18, 23 y 24).

Estado del pliegue vocal	Posición del CAP (en $\mu\text{m}$ )	Posición del TA (en $\mu\text{m}$ )	Región de solapamiento ( $\mu\text{m}$ )
0 y +	-200 / 2250 *	-200 / 1250 *	1450 *
++	-215 $\pm$ 925 / 1610 $\pm$ 435	200 $\pm$ 1130 / 1775 $\pm$ 885	1200 $\pm$ 470
Todos	-215 $\pm$ 845 / 1700 $\pm$ 465	145 $\pm$ 1045 / 1700 $\pm$ 835	1240 $\pm$ 555
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica. El punto de referencia es el óbex. CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 1) +. Animales con movimiento mínimo en el pliegue vocal ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos a los del control (n = 5) * Resultados obtenidos de un animal Pliegue vocal no observado en 1 animal			

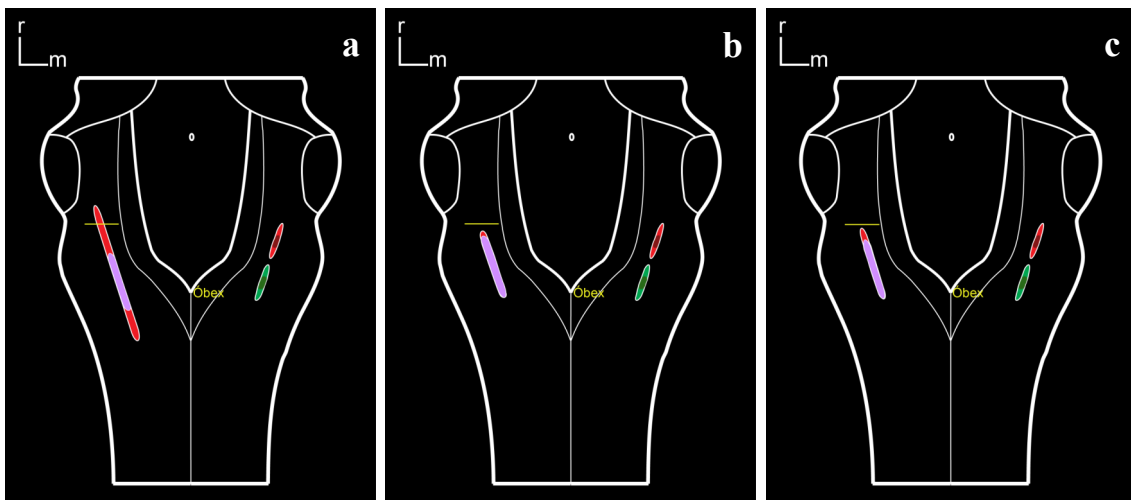
**Tabla 22.** Localización de las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides en el grupo con doce semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

Estado del pliegue vocal	Posición del CAP (en $\mu\text{m}$ )	Posición del TA (en $\mu\text{m}$ )	Región de solapamiento ( $\mu\text{m}$ )
0 y +	-1050 / 2500 *	-650 / 1100 *	1750 *
++	-140 $\pm$ 1015 / 1720 $\pm$ 480	-190 $\pm$ 1345 / 1580 $\pm$ 785	1525 $\pm$ 640
Todos	-290 $\pm$ 980 / 1850 $\pm$ 535	-265 $\pm$ 1215 / 1500 $\pm$ 730	1570 $\pm$ 565
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica. El punto de referencia es el óbex. CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 1) +. Animales con movimiento mínimo en el pliegue vocal ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos a los del control (n = 6) * Resultados obtenidos de un animal			

**Tabla 23.** Localización de las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides en el grupo con dieciséis semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.



**Figura 23.** Diagramas esquemáticos de una visión dorsal del tronco del encéfalo que representan la distribución de las neuronas trazadas doce semanas después de la lesión en el nervio laríngeo recurrente desde los músculos cricoaritenideo posterior (color rojo) y tiroaritenideo (color verde). En color violeta se representa la superposición de ambas poblaciones, mostrando la región de solapamiento. Imagen **a**: distribución de las neuronas trazadas obtenida del único animal con el pliegue vocal paralizado. Imagen **b**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales que han recuperado la movilidad en el pliegue vocal. Obsérvese que la distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior solapa con la región de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo. Imagen **c**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de todos los animales que componen el grupo. En el lado derecho aparecen representadas las neuronas trazadas en el grupo control y la barra amarilla indica el límite rostral donde se han identificado neuronas trazadas en el grupo control.



**Figura 24.** Diagramas esquemáticos de una visión dorsal del tronco del encéfalo que representan la distribución de las neuronas trazadas dieciséis semanas después de la lesión en el nervio laríngeo recurrente desde los músculos cricoaritenideo posterior (color rojo) y tiroaritenideo (color verde). En color violeta se representa la superposición de ambas poblaciones, mostrando la región de solapamiento. Imagen **a**: distribución de las neuronas trazadas obtenida del único animal con el pliegue vocal paralizado. Imagen **b**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de los animales que han recuperado la movilidad en el pliegue vocal. Obsérvese que la distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior solapa con la región de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo. Imagen **c**: distribución de las neuronas trazadas obtenida de todos los animales que componen el grupo. En el lado derecho aparecen representadas las neuronas trazadas en el grupo control y la barra amarilla indica el límite rostral donde se han identificado neuronas trazadas en el grupo control.

## 2.3 Número de neuronas trazadas

El número de neuronas trazadas en los grupos experimentales es heterogéneo entre ellos y presenta grandes diferencias con respecto al grupo control.

En el grupo de animales de una semana post-lesión las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenioideo posterior variaron entre 112 y 249, con una media de  $166 \pm 57$  (tabla 24). Este promedio es muy superior al obtenido en el grupo control. Para el músculo tiroaritenioideo la media fue de  $17 \pm 17$ , con un rango entre 1 y 42, lo que arroja una media bastante por debajo de la cuantificada en el grupo control. La variabilidad es tan acusada porque en tres animales solo se contabilizaron una, tres y ninguna neuronas respectivamente.

Estado del pliegue vocal	CAP	TA
0	$166 \pm 57$	$17 \pm 17$
<b>Control</b>	<b><math>41 \pm 14</math></b>	<b><math>31 \pm 14</math></b>
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 6) CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenioideo posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenioideo		

**Tabla 24.** Número de neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenioideo posterior y tiroaritenioideo en el grupo de animales con una semana de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

A las dos semanas de practicar la lesión, el número medio de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenioideo posterior fue  $73 \pm 51$  (entre 4 y 137), cantidad inferior a la registrada en la primera semana pero superior a la del grupo control. En los siete animales con el pliegue vocal paralizado el número de neuronas osciló entre 4 y 131, mientras que en los dos animales con movilidad en el pliegue vocal fue de 93 y 137. El número medio de neuronas contabilizadas desde el músculo tiroaritenioideo fue de  $55 \pm 48$ , mayor al registrado en la primera semana y el del grupo control. Al igual que en el grupo de una semana, la gran variabilidad se debió a que en tres animales no se trazó ninguna neurona y en otros dos solo dos y cinco. Sin embargo, es destacable que en los dos animales con el pliegue vocal móvil, el número de neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenioideo estaba entre los tres valores más altos registrados de este grupo (tabla 25).

Estado del pliegue vocal	CAP	TA
0 y +	62 ± 50	38 ± 51
++	115 ± 31	91 ± 11
Todos	73 ± 51	55 ± 48
<b>Control</b>	<b>41 ± 14</b>	<b>31 ± 14</b>
Los datos se expresan como media ± desviación típica 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 4) +. Animales con movimiento en el pliegue vocal muy restringido (n = 3) ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos al control (n = 2) CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides		

**Tabla 25.** Número de neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides en el grupo de animales con dos semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

En los animales con cuatro semanas de supervivencia el número medio de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior fue de  $66 \pm 93$ , variando entre 13 y 156 (tabla 26). Las neuronas trazadas en los dos animales con movilidad en el pliegue vocal fueron 1 y 222 (tabla 26). En el trazado del músculo tiroaritenoides las neuronas identificadas oscilaron entre 71 y 81 con una media de  $75 \pm 6$  (tabla 26). En los dos animales con el pliegue vocal inmóvil el número de neuronas trazadas fue de  $81 \pm 4$  y en los dos animales con el pliegue vocal no paralizado el número medio fue de  $75 \pm 6$ .

Estado del pliegue vocal	CAP	TA
0 y +	13 *	81 ± 4
++	112 ± 156	71 ± 6
Todos	66 ± 93	75 ± 6
<b>Control</b>	<b>41 ± 14</b>	<b>31 ± 14</b>
Los datos se expresan como media ± desviación típica 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 1) +. Animales con movimiento en el pliegue vocal muy restringido (n = 1) ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos al control (n = 2) CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides * Resultados obtenidos únicamente de un animal Pliegue vocal no observado en 2 animales		

**Tabla 26.** Número de neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides en el grupo de animales con cuatro semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

En los animales con seis semanas de supervivencia el número medio de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior fue de  $43 \pm 33$  (entre 33 y 56; tabla 27). En los animales con el pliegue vocal paralizado el total varió entre 9 y 79 con una media de 33

$\pm 40$  (tabla 27). En los animales con el pliegue vocal móvil el intervalo se encontraba entre 16 y 76 y su media fue de  $56 \pm 34$  (tabla 27). Los resultados para el músculo tiroaritenoides arrojaron una media muy baja de  $12 \pm 14$ , oscilando entre 0 y 36 neuronas trazadas lo que se debe, con toda seguridad, a un conjunto de inyecciones fallido por causas que no podemos determinar. En los animales con el pliegue vocal paralizado se trazaron 0, 4 y 14 neuronas, lo que arroja una media de  $9 \pm 7$  (tabla 27). En los 3 animales con el pliegue vocal móvil se contabilizaron 0, 1 y 4, con una media de  $3 \pm 2$  (tabla 27).

Estado del pliegue vocal	CAP	TA
0 y +	$33 \pm 40$	$9 \pm 7$
++	$56 \pm 34$	$3 \pm 2$
Todos	$43 \pm 33$	$12 \pm 14$
<b>Control</b>	<b><math>41 \pm 14</math></b>	<b><math>31 \pm 14</math></b>
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 3) +. Animales con movimiento en el pliegue vocal muy restringido ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos al control (n = 3) CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides Pliegue vocal no observado en 1 animal		

**Tabla 27.** Número de neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides en el grupo de animales con seis semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

Ocho semanas después de la lesión en el nervio laríngeo recurrente el número medio de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior fue de  $38 \pm 40$  (entre 14 y 92), muy semejante al obtenido en los controles (tabla 28). En los dos animales con el pliegue vocal paralizado el número de neuronas trazadas fue 77 y 107, y en los cinco animales con el pliegue vocal móvil las neuronas contabilizadas estaban entre 1 y 52 (tabla 28). En el número medio de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides fue de  $44 \pm 39$  (entre 2 y 100), siendo 2 y 64 las trazadas en los animales con el pliegue vocal inmóvil y una media de  $48 \pm 42$  en los 5 animales con el pliegue móvil (entre 6 y 100; tabla 28).

Estado del pliegue vocal	CAP	TA
0 y +	92 ± 21	33 ± 44
++	14 ± 21	48 ± 42
Todos	38 ± 40	44 ± 39
<b>Control</b>	<b>41 ± 14</b>	<b>31 ± 14</b>
Los datos se expresan como media ± desviación típica 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 2) +. Animales con movimiento en el pliegue vocal muy restringido ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos al control (n = 5) CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo Pliegue vocal no observado en 1 animal		

**Tabla 28.** Número de neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo en el grupo de animales con ocho semana de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

Doce semanas después de la lesión del nervio laríngeo recurrente el número medio de neuronas trazadas para el músculo cricoaritenideo posterior fue de  $35 \pm 18$  (con un rango entre 8 y 59; tabla 29), en los animales con movimiento en el pliegue vocal fue  $37 \pm 34$  (entre 8 y 59) y de 25 en el único animal con el pliegue vocal paralizado. En el trazado del músculo tiroaritenideo la media de las neuronas identificadas fue de  $30 \pm 31$  (entre 2 y 80), siendo de  $36 \pm 18$  en los animales con el pliegue móvil y de 15 en el único animal que mantiene el pliegue vocal paralizado (tabla 29).

Estado del pliegue vocal	Número CAP	Número TA
0 y +	25 *	15 *
++	37 ± 34	36 ± 18
Todos	35 ± 18	30 ± 31
<b>Control</b>	<b>41 ± 14</b>	<b>31 ± 14</b>
Los datos se expresan como media ± desviación típica 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 1) +. Animales con movimiento en el pliegue vocal muy restringido ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos al control (n = 5) CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo * Resultados obtenidos únicamente de un animal Pliegue vocal no observado en 1 animal		

**Tabla 29.** Número de neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo en el grupo de animales con doce semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

En el grupo experimental más longevo, dieciséis semanas después de la lesión en el nervio laríngeo recurrente izquierdo, el número de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior estaba entre 1 y 200, resultando una media de  $121 \pm 63$  (tabla 30),

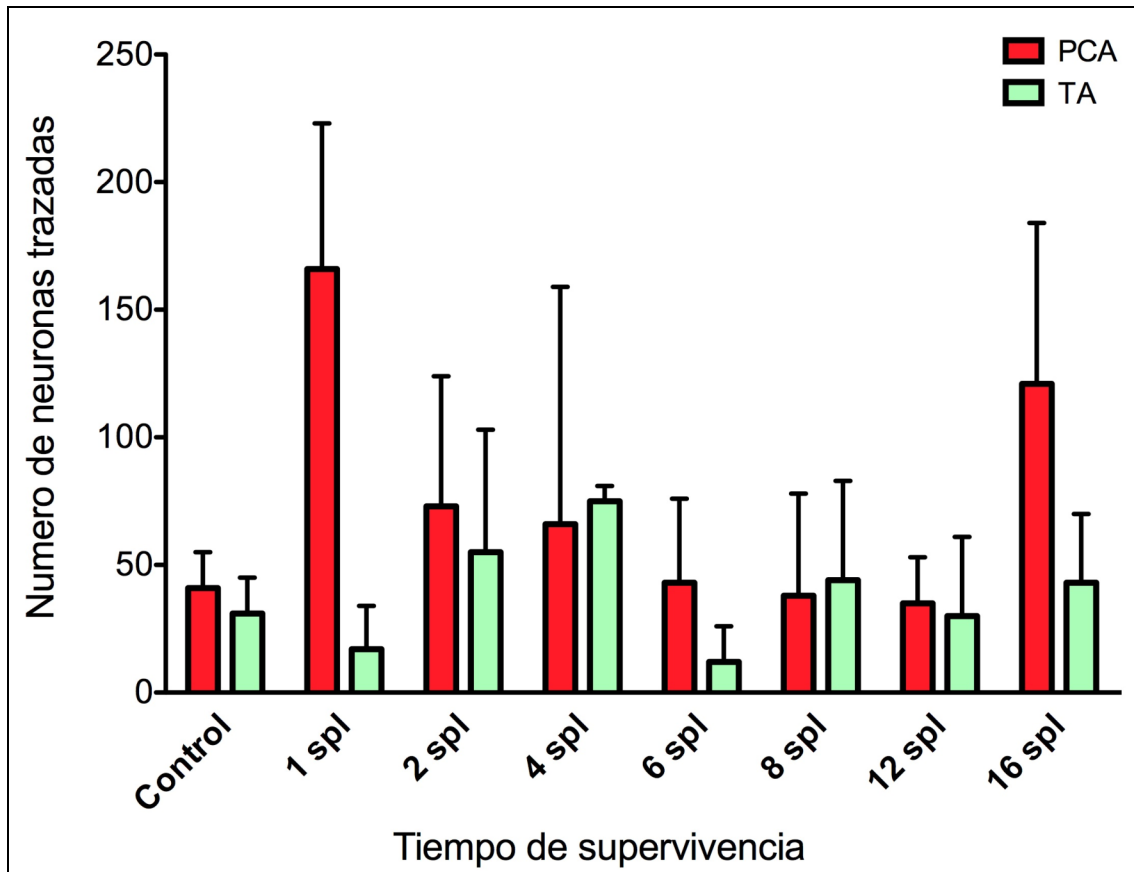
siendo la media en los animales que presentan movilidad en el pliegue vocal de  $137 \pm 42$  (entre 1 y 200), mientras que el número registrado en el único animal con el pliegue vocal paralizado fue de 155 (tabla 30). El número medio de neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides fue  $52 \pm 23$ , con un rango entre 1 y 84 (tabla 30). En el único animal con el pliegue vocal paralizado, el trazado fue de 38 neuronas (tabla 30).

Estado del pliegue vocal	Número CAP	Número TA
0 y +	155 *	38 *
++	$137 \pm 42$	$52 \pm 23$
Todos	$121 \pm 63$	$43 \pm 27$
<b>Control</b>	<b><math>41 \pm 14</math></b>	<b><math>31 \pm 14</math></b>
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica 0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado (n = 1) +. Animales con movimiento en el pliegue vocal muy restringido ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos al control (n = 6) CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior TA. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides * Resultados obtenidos únicamente de un animal		

**Tabla 30.** Número de neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides en el grupo de animales con dieciséis semanas de supervivencia después de la lesión del nervio laríngeo recurrente.

Analizando conjuntamente todos los grupos experimentales se puede determinar una evolución del número de neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides en el que se puede observar una tendencia en el número medio que se aproxima al contabilizado en el grupo control (figura 25) y que el número de neuronas localizadas en posición rostral al músculo cricoaritenoides control se reduce considerablemente hasta casi ser nulo (tabla 31, figura 26).

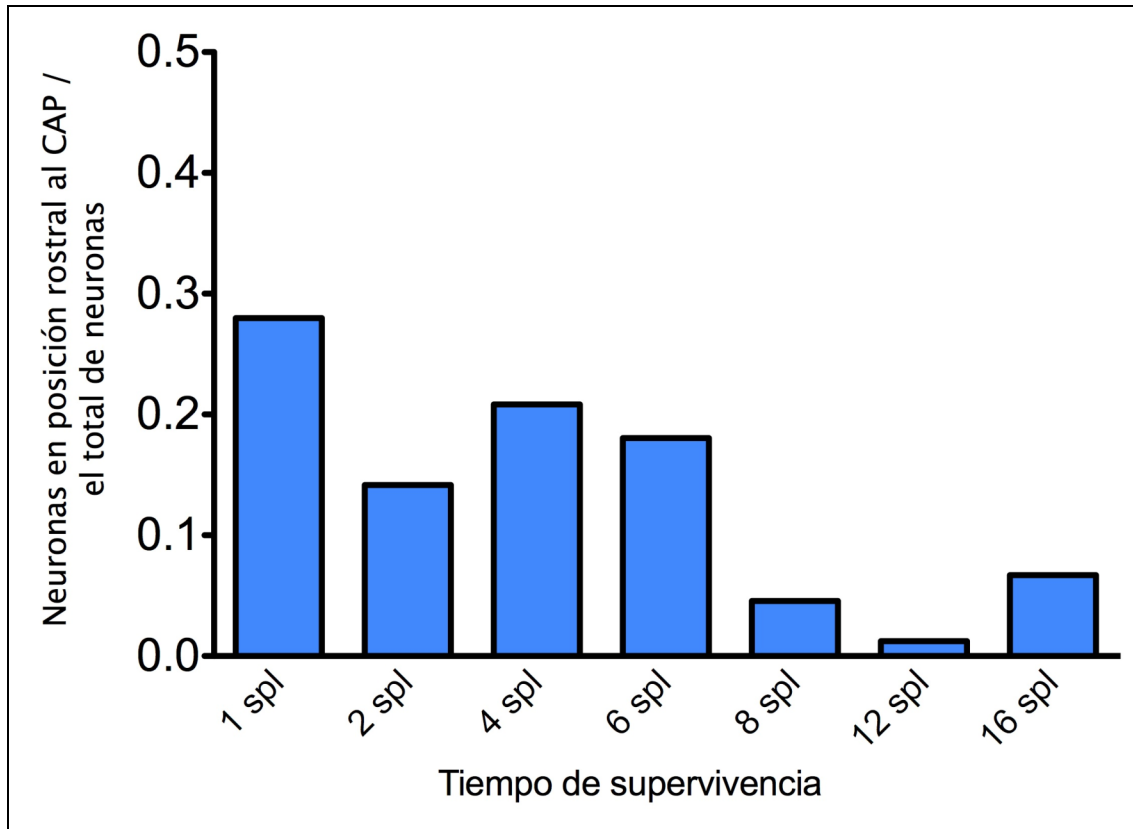




**Figura 25.** Gráfica que describe la evolución del número de neuronas trazadas desde los dos músculos estudiados. El color rojo representa el número de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior y el color verde las trazadas desde el músculo tiroaritenideo. El número de neuronas trazadas presenta una alta variabilidad hasta las 12 semanas, donde el número se aproxima al control.

Tiempo de supervivencia	Estado del pliegue	Número de neuronas totales	Números de neuronas en el área rostral al CAP	Rostral al CAP / Total
1 semana	0	1079	302	0,28
2 semanas	0 y +	549	74	0,13
2 semanas	++	411	62	0,15
4 semanas *	0 y +	96	38	0,40
4 semanas *	++	341	53	0,16
6 semanas *	0 y +	116	52	0,45
6 semanas *	++	172	0	0
8 semanas *	0 y +	236	21	0,09
8 semanas *	++	312	4	0,01
12 semanas *	0 y +	38	2	0,05
12 semanas *	++	364	3	0,01
16 semanas	0 y +	190	19	0,1
16 semanas	++	884	53	0,06
0. Animales con el pliegue vocal totalmente paralizado +. Animales con movimiento en el pliegue vocal muy restringido ++. Animales con movimiento de abducción y aducción próximos al control CAP. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior del grupo control * Se han eliminado los experimentos en los que no ha podido ser observado el estado de los pliegues vocales				

**Tabla 31.** Relación entre el número de neuronas trazadas totales y el número de neuronas identificadas únicamente por encima de la región representativa del músculo cricoaritenoides posterior en el núcleo ambiguo en el grupo control. La relación generalmente es menor en los animales que ha recuperado la movilidad del pliegue vocal a excepción del estadio de 2 semanas.



**Figura 26.** Representación de la relación de las neuronas localizadas en posición rostral a las correspondientes al músculo cricoaritenideo posterior (CAP) control con respecto al número total de neuronas trazadas de 1 a 16 semanas post-lesión (spl: semanas post-lesión).

## **DISCUSIÓN**

Nuestro estudio muestra la distribución, en el núcleo ambiguo y a lo largo de diferentes tiempos de supervivencia, de las neuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo en animales que han sufrido una axonotmesis por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente. En los animales control, las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo se distribuyen en dos poblaciones discretas, con las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior en posición rostral a las trazadas desde el músculo tiroaritenideo. Cada una de las poblaciones ocupa un milímetro de extensión rostrocaudal, y en ambas hay una región central, de 350  $\mu\text{m}$  de extensión, donde se localizan el 50% de las neuronas trazadas. La lesión por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente, en los grupos experimentales, provoca, para todos los intervalos de tiempo estudiados desde la lesión, una desorganización de la somatotopía descrita en el grupo control. Una semana después de la lesión las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior se localizan en una posición más rostral a la observada en el grupo control y, aunque a lo largo del tiempo las neuronas trazadas tienden a ubicarse dentro de los límites del núcleo ambiguo control, no hay ningún caso en el que se recupere el patrón somatotópico normal. Estas modificaciones del mapa somatotópico van acompañadas de una alteración en el número de neuronas que inerva cada músculo en los animales lesionados comparado con el de los controles, si bien hay una tendencia asociada al tiempo de supervivencia a recuperar los registros obtenidos en el grupo control. Funcionalmente, la lesión por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente se traduce en una parálisis del pliegue vocal ipsilateral desde el momento del daño. Esta parálisis se revierte en función del tiempo de supervivencia, de modo que en todos los animales de los grupos de mayor tiempo post-lesión se ha recuperado la motilidad de los pliegues afectados.

## **1. CONSIDERACIONES TÉCNICAS**

Se eligió la CTb porque había sido utilizada de manera eficaz en otros trabajos de trazado de los músculos laríngeos (Bieger y Hopkins, 1987; Saxon y cols., 1996; Yoshida y cols., 1998; Berkowitz y cols., 1999; Hayakawa y cols., 1999; Waldbaum y cols., 2001). Además, el empleo de la CTb minimiza la posibilidad de contaminación a otras estructuras, lo que representa una ventaja frente a otros trazadores tal y como es admitido en varios trabajos de trazado retrógrado (Gacek, 1975; Hinrichsen y Ryan, 1981; Davis y Nail, 1984; Okubo y

cols., 1987; Flint y cols., 1991). Para la identificación de las neuronas que inervan los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides, la CTb se aplicó mediante inyección intramuscular, tal y como aparece descrito en otros estudios de trazado de los músculos intrínsecos laríngeos (Gacek, 1975; Hinrichsen y Ryan, 1981; Yoshida y cols., 1982, 1984, 1985, 1987, 1998; Pásaro y cols., 1983; Hisa y cols., 1984a; Davis y Nail, 1984; Bieger y Hopkins, 1987; Kitamura y cols., 1987; Basterra y cols., 1987; Hisa y Sato, 1987; Okubo y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988ab; Nahm y cols., 1990, 1993; Flint y cols., 1991; Saxon y cols., 1996; Berkowitz y cols., 1999; Hayakawa y cols., 1999; Hirasugi y cols., 2007; Hydman y Mattsson, 2008, van Daele y Cassell, 2009). La inyección del músculo cricoaritenoides posterior requirió de la rotación de la laringe hacia el lado contralateral a la inyección, mientras que para el músculo tiroaritenoides fue preciso abrir una ventana en la lámina del cartílago tiroideos. Los abordajes de estos dos músculos son similares a los descritos en la literatura por la mayoría de los autores, independientemente de la especie utilizada (Gacek, 1975; Hinrichsen y Ryan, 1981; Yoshida y cols., 1982, 1985, 1987, 1998; Pásaro y cols., 1983; Hisa y cols., 1984a; Davis y Nail, 1984; Kitamura y cols., 1987; Basterra y cols., 1987; Hisa y Sato, 1987; Okubo y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988ab; Nahm y cols., 1990, 1993; Flint y cols., 1991; Berkowitz y cols., 1999; Hayakawa y cols., 1999; Hirasugi y cols., 2007; Hydman y Mattsson, 2008). Independientemente de las bondades de este trazador, no podemos descartar completamente la posibilidad de una difusión accidental del mismo que provoque el trazado de neuronas que inervan estructuras adyacentes a los objeto de nuestro estudio (Grkovic y cols., 2005), como sucedió en los primeros animales intervenidos. En estos casos, la difusión se debió a que no podíamos controlar adecuadamente el proceso de inyección y cuando la CTb salía de la aguja lo hacía de golpe, bañando toda la región alrededor del punto de inyección. Cuando observamos al microscopio las preparaciones del tronco del encéfalo de esos animales confirmamos la presencia de neuronas trazadas correspondientes a estructuras ajenas a los músculos laríngeos. Finalmente solventamos este inconveniente rellenando el interior de la jeringa con glicerina, lo que permitía el control del flujo de inyección para depositar el trazador exclusivamente en el músculo deseado. En el otro extremo encontramos aquellas inyecciones que resultaron en el trazado de escasas o ninguna neurona. Una de las razones puede ser la más que probable variabilidad en el proceso de reinervación entre los animales de cada grupo, variabilidad que aparece reflejada en otros trabajos de trazado de los músculos laríngeos durante el proceso de reinervación (Nahm y cols., 1990, 1993). La subunidad B de la CTb se une al gangliosido GM1 de los terminales sinápticos, es incorporada

al citoplasma de la neurona y es transportada retrógradamente hasta el soma (Vercelli y cols., 2000; Conte y cols., 2009). La velocidad de transporte en el nervio de la CTb es de 3 mm a la hora como máximo. Este valor viene determinado en relación con la distancia que debe recorrer el trazador y la velocidad de transporte retrogrado que se ha hallado en los trazadores de la familia de los dextranos (Fritzsche, 1993; Vercelli y cols., 2000; Pascual-Font y cols., 2011). En nuestros experimentos, el tiempo de supervivencia de los animales tras la inyección del trazador en los músculos laríngeos estudiados estuvo comprendido entre 1 y 3 días, que es el periodo de tiempo empleado por la mayoría de los autores consultados (Bieger y Hopkins, 1987; Saxon y cols., 1996; Yoshida y cols., 1998; Berkowitz y cols., 1999; Hayakawa y cols., 1999). Además, este intervalo de tiempo permite el equilibrio necesario para el transporte de una cantidad claramente identificable que se pueda observar en el soma de la neurona antes de que se produzca la degradación de la misma (Vercelli y cols., 2000).

Para identificar de manera precisa la posición de las neuronas trazadas en el tronco del encéfalo introdujimos un factor de corrección de la localización de las neuronas que compensase las desviaciones producidas al seccionar las muestras. En nuestros experimentos observamos que el plano de sección del tronco del encéfalo no era completamente transversal. Tras el cálculo y la aplicación del factor que corrige la orientación del corte del tronco del encéfalo se redujo la variabilidad de la localización de las neuronas con respecto al óbex, resumido en una reducción a la desviación típica. Este factor de corrección que hemos aplicado no aparece reflejado por el resto de los trabajos consultados en la literatura, lo que podría explicar las diferencias de la organización del núcleo ambiguo entre los diferentes autores. Además, otra aspecto que es fuente de variabilidad en la posición de las neuronas trazadas es el punto de referencia utilizado porque si bien la mayoría de los trabajos basan la posición de las neuronas trazadas con respecto al óbex, esta referencia anatómica es identificada de manera diferente según el artículo consultados. De este modo, para algunos de los autores la identificación del óbex corresponde con la apertura del canal central hacia el cuarto ventrículo (Portillo y Pásaro, 1988ab; Hirasugi y cols., 2007), mientras que en el artículo de Hamilton y Norgren (1984), que es la interpretación que seguimos nosotros, la posición del óbex estaría situada caudalmente 0,8 mm y se define como el punto en la línea media de la médula oblongada dorsal que marca el ángulo caudal de la fosa romboidea.

El análisis de la motilidad de los pliegues vocales se realiza por medio de la observación endoscópica de la laringe. La observación de los pliegues vocales nos permitió evaluar la evolución temporal de la recuperación del movimiento del pliegue vocal después de la axonotmesis y es un método que ha sido empleado en varios trabajos que valoraban la reinervación funcional de los músculos intrínsecos laríngeos (Marie y cols., 1989; Nahm y cols., 1993; Inagi y cols., 1997; Sanuki y cols., 2000; de Corgnol y cols., 2011; Old y cols., 2011; Paviot y cols., 2011). En nuestros experimentos la laringoscopia se ha visto dificultada en algunos casos porque, tras la introducción del laringoscopio, se producía un descenso de la epiglotis que impedía la visualización de los pliegues vocales. En otros casos, era la abundante secreción de saliva lo que dificultaba obtener una imagen clara del movimiento de los pliegues vocales. Esta última dificultad era parcialmente salvada con la administración de pequeñas dosis de atropina. Finalmente, en algunos casos ha sido imposible realizar la observación endoscópica de la laringe porque la cavidad oro-faríngea se hallaba llena de comida. En todos los casos en los que fue posible observar los pliegues vocales inmediatamente después de la cirugía de lesión del nervio laríngeo recurrente se constató que, efectivamente, la lesión producía una parálisis en el pliegue vocal ipsilateral. Para el seguimiento de la evolución de la motilidad del pliegue vocal a lo largo del tiempo establecimos una escala que es una variación de la utilizada en estudios previos (Marie y cols., 1989; Inagi y cols., 1997; de Corgnol y cols., 2011; Paviot y cols., 2011). El empleo de esta escala, que sistematiza la recuperación de la motilidad del pliegue vocal, permite determinar mejor el proceso de reinervación de los músculos denervados que el registro realizado por otros autores, limitado únicamente a determinar si el pliegue vocal está paralizado o presenta movilidad (Nahm y cols., 1993; Sanuki y cols., 2000).

## **2. REPRESENTACIÓN SOMATOTÓPICA DE LOS MÚSCULOS CRICOARITENOIDEO POSTERIOR Y TIROARITENOIDEO**

### **2.1 Distribución de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior y el músculo tiroaritenoides.**

Los experimentos de trazado de los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides muestran que las neuronas que inervan el cricoaritenoides posterior están localizadas ipsilateralmente en una columna rostrocaudal que se extiende, rostralmente al óbex, desde 910 hasta 1930  $\mu\text{m}$ , mientras que el territorio del tiroaritenoides es más caudal y



la columna de neuronas, también ipsilateral, ocupa desde 280  $\mu\text{m}$ , caudalmente al óbex, hasta los 750  $\mu\text{m}$  rostralmente a éste. De nuestros resultados se desprende que no hay territorio de solapamiento entre las dos poblaciones. En ningún caso se identificaron neuronas trazadas en otros núcleos del tronco del encéfalo, incluyendo el núcleo dorsal del vago o el núcleo del tracto solitario.

La mayoría de los autores defiende la existencia de una proyección exclusivamente ipsilateral desde el núcleo ambiguo (Gacek, 1975; Hinrichsen y Ryan, 1981, 1982; Yoshida y cols., 1982, 1984, 1985, 1987, 1998; Pásaro y cols., 1983; Hisa y cols., 1984a; Davis y Nail, 1984; Basterra y cols., 1987; Okubo y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988ab; Nahm y cols., 1990; Flint y cols., 1991; Hirasugi y cols., 2007; Hydman y Mattson, 2008; van Daele y Cassell, 2009), aunque algunos han descrito una proyección bilateral de las neuronas ambiguales (Wetzel y col., 1980; Lobera y cols., 1981; Pásaro y cols., 1981; Berkowitz y cols., 1999; Waldbaum y cols., 2001). Nuestros resultados son coherentes con los obtenidos del trazado de los nervios laríngeos o del nervio vago que muestran que la proyección del ambiguo es exclusivamente ipsilateral (Bieger y Hopkins, 1987; Pascual-Font y cols., 2006ab, 2011). La localización de neuronas contralaterales al lado trazado puede ser explicada por la difusión del trazador, que impregnaría las terminaciones de las neuronas que inervan los músculos del lado contralateral, tal y como admiten algunos autores (Gacek, 1975; Berkowitz y cols., 1999).

La ubicación rostral de las neuronas del músculo cricoaritenoidio posterior con respecto a las del músculo tiroaritenoidio está descrita en varios artículos (Szentàgothai, 1943; Yoshida y cols., 1982, 1985, 1987, 1998; Davis y Nail, 1984; Kitamura y cols., 1987; Okubo y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988a; Berkowitz y cols., 1999; Hirasugi y cols., 2007; van Daele y Cassell, 2009), aunque otros trabajos no coinciden con este patrón somatotópico de los músculos cricoaritenoidio posterior y tiroaritenoidio (Gacek, 1975; Hinrichsen y Ryan, 1981; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Basterra y cols., 1987; Hisa y Sato, 1987; Nahm y cols., 1990; Flint y cols., 1991). Así, en algunos de estos trabajos, se concluye que la población de neuronas que inervan el músculo cricoaritenoidio posterior se encuentra en posición ligeramente rostral a la población de neuronas que inervan el músculo tiroaritenoidio, solapándose ambas poblaciones (Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Hisa y Sato, 1987), mientras que para otros autores las neuronas que inervan ambos músculos se localizan en la misma región (Hinrichsen y Ryan, 1981; Nahm y cols., 1990; Flint y cols.,

1991). En dos trabajos, realizados en gato, incluso se ha descrito que las neuronas que inervan el músculo cricoaritenideo posterior se distribuyen en dos poblaciones discretas distribuidas en dos segmentos diferentes en el eje rostrocaudal del tronco del encéfalo, mientras que las neuronas que inervan el músculo tiroaritenideo se agrupan en una única población localizada en el mismo intervalo de la médula oblongada que la población más caudal del músculo cricoaritenideo posterior (Pásaro y cols., 1983) o, al igual que el cricoaritenideo posterior, en dos poblaciones discontinuas (Gacek, 1975). En ningún otro trabajo se han descrito dos poblaciones independientes, ya sea en el gato (Yoshida y cols., 1982, 1998; Davis y Nail, 1984) o en otras especies (Szentágothai, 1943; Hinrichsen y Ryan, 1981; Yoshida y cols., 1985, 1987; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Basterra y cols., 1987; Hisa y Sato, 1987; Kitamura y cols., 1987; Okubo y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988a; Nahm y cols., 1990, 1993; Flint y cols., 1991; Berkowitz y cols., 1999; Hirasugi y cols., 2007; van Daele y Cassell, 2009). La explicación a la aparición de dos poblaciones puede fundamentarse en la técnica de trazado, por la captación accidental del trazador por neuronas que inervan estructuras adyacentes al músculo que era inyectado al difundir desde éste. Finalmente, en solo un trabajo, desarrollado en el cobaya, el polo rostral de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior está localizado más caudalmente al polo rostral de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenideo (Basterra y cols., 1987).

Las contradicciones en la organización somatotópica descritas por diferentes autores podrían explicarse por las diferencias entre las diversas especies utilizadas como modelo, ya que la representación somatotópica de los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo es parecida en algunos trabajos desarrollados en perro, gato y mono pero diferente a la de la rata (Szentágothai, 1943; Yoshida y cols., 1982, 1985, 1987, 1998; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Hisa y Sato, 1987). En la misma dirección, la organización del núcleo ambiguo en el conejo es distinta a la descrita en otros animales (Lawn, 1966ab; Okubo y cols., 1987), lo que apoyaría la idea de que la localización de las motoneuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo no sea comparable entre distintos animales, en especial con la rata (Davis y Nail, 1984; Kitamura y cols., 1987; Okubo y cols., 1987). De manera análoga, la organización del núcleo ambiguo del cobaya no es del todo comparable a otros modelos, pues incluso los resultados obtenidos en dos estudios realizados en este animal no son coincidentes entre sí (Basterra y cols., 1987; Nahm y cols., 1990). Otra explicación posible a la disparidad de resultados, adicional a las diferencias interespecíficas, es

la derivada de la técnica de identificación de las neuronas, bien por el tipo de trazador empleado, bien por la técnica misma de aplicación del trazador, explicación que encuentra evidencia en la heterogeneidad de resultados observada entre los trabajos realizados en gato (Gacek, 1975; Yoshida y cols., 1982, 1998; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984) y en la rata (Hinrichsen y Ryan, 1981; Portillo y Pásaro, 1988ab; Flint y cols, 1991; Berkowitz y cols., 1999; Hirasugi y cols., 2007; van Daele y Cassell, 2009). En el caso concreto del modelo de rata, si bien la organización de las neuronas descrita por nosotros es similar a la presentada en algunos artículos (Portillo y Pásaro, 1988a; Hirasugi y cols., 2007), en otros casos la localización de las poblaciones que inervan los músculos cricoaritenosoide posterior y tiroaritenosoide presenta diferencias significativas (Berkowitz y cols., 1999; van Daele y Cassell, 2009) que podrían deberse a una incorrecta interpretación de la localización del óbex como punto de referencia, tal y como aparece explicado exhaustivamente en el artículo de Hamilton y Norgren (1984). Este artículo argumenta que algunos autores pueden confundir la identificación del óbex, error que supone interpretar que las neuronas trazadas están localizadas 0,8 mm más caudales con respecto al auténtico óbex (Hamilton y Norgren, 1984; Paxinos y Watson, 2005). Una vez “corregida” y determinada la localización de las neuronas con las referencias citadas, a partir de los datos obtenidos en los artículos de Portillo y Pásaro (1988a) y de Hirasugi y colaboradores (2007), se puede concluir que la organización somatotópica descrita en estos dos trabajos se aproxima bastante a la de los resultados de nuestro grupo control.

Los resultados de nuestro grupo control muestran que no hay un territorio de solapamiento entre la población de neuronas que inervan el músculo cricoaritenosoide posterior y la población que inerva el músculo tiroaritenosoide. Esta observación es compartida por algunos autores (Portillo y Pásaro, 1988a; Hirasugi y cols., 2007). No obstante, en otros trabajos se sostiene que las neuronas que inervan estos dos músculos comparten una amplia región dentro del núcleo ambiguo (Szentágothai, 1943; Gacek, 1975; Hinrichsen y Ryan, 1981; Yoshida y cols., 1982, 1985, 1987, 1998; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Basterra y cols., 1987; Hisa y Sato, 1987; Kitamura y cols., 1987; Okubo y cols., 1987; Flint y cols, 1991; Nahm y cols, 1990, 1993). Los resultados de los dos trabajos desarrollados en rata que muestran un territorio de solapamiento entre ambas poblaciones (Hinrichsen y Ryan, 1981; Flint y cols., 1991) describen un mapa somatotópico discrepante tanto con nuestros datos como con los de otros trabajos previos (Portillo y

Pásaro, 1988a; Berkowitz y cols., 1999; Hirasugi y cols., 2007; van Daele y Cassell, 2009). Al igual que ha sido expuesto anteriormente, la principal razón de estas discrepancias podría deberse a las diferencias y dificultades técnicas de la aplicación del trazador en los músculos intervenidos, lo que puede resultar en resultados positivos falsos. Finalmente, las diferencias en la organización somatotópica de la formación laringomotora de la rata y las de otras especies animales puede ser el reflejo de la particular configuración de la laringe de la rata en comparación con otras especies. Así, en la rata no existe el músculo aritenioideo (Kobler y cols., 1994; Inagi y cols., 1997) y su acción es suplida por los músculos cricoaritenioideo alar y cricoaritenioideo superior, exclusivos de la rata. La posibilidad de que las neuronas que inervan cualquiera de estos dos músculos se encuentren localizadas entre las del músculo cricoaritenioideo posterior y las del músculo tiroaritenioideo debe ser contemplada.

Según los resultados presentados en este trabajo, la localización de las neuronas que inervan los músculos cricoaritenioideo posterior y tiroaritenioideo sigue un patrón rostrocaudal pero no dorsomedial o lateromedial. La mayoría de los autores consultados solo han identificado un patrón de distribución rostrocaudal (Szentágothai, 1943; Hinrichsen y Ryan, 1981; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Basterra y cols., 1987; Hisa y Sato, 1987; Kitamura y cols., 1987; Okubo y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988a; Nahm y cols., 1990, 1993; Hirasugi y cols., 2007) pero, no obstante, se ha descrito un patrón dorsoventral en el gato (Gacek, 1975; Yoshida y cols., 1982, 1998) y en el mono (Yoshida y cols., 1985; 1987), y uno lateromedial en la rata (Flint y cols., 1991). Consideramos que, en el caso del mono y el gato, la organización somatotópica dorsoventral, a falta de datos que la contradigan, puede ser debida a las diferencias en la organización del núcleo ambiguo entre especies distintas. El artículo de Flint y colaboradores (1991), es el único desarrollado en la rata que ha identificado una distribución lateromedial de las poblaciones de motoneuronas que inervan distintos músculos. Actualmente no encontramos argumentos para debatir sobre esta conclusión, que no ha encontrado refrendo en el resto de los estudios similares desarrollados en la rata.

## 2.2 Cuantificación de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior y el músculo tiroaritenideo.

Nuestros resultados muestran que la media de las neuronas trazadas es de 41 desde el músculo cricoaritenideo posterior y de 31 desde el músculo tiroaritenideo. El número de neuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo contabilizadas por el resto de los autores es muy variable y se encuentra entre 11 y 288 (Gacek, 1975; Hinrichsen y Ryan, 1981; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Portillo y Pásaro, 1988a; Flint y cols., 1991; Berkowitz y cols., 1999). Algunos de los autores han observado un número equiparable al de nuestros experimentos del grupo control (Hinrichsen y Ryan, 1981; Portillo y Pásaro, 1988a; Flint y cols., 1991) pero en otros trabajos el número es muy dispar (Gacek, 1975; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Berkowitz y cols., 1999). Todos estos estudios cuyos resultados no coinciden con los nuestros, con excepción del desarrollado por Berkowitz y colaboradores (1999), han sido llevados a cabo en animales diferentes de la rata, lo que podría significar que la divergencia de la contabilización de las neuronas proviene del tipo de especie analizada. En la rata, el número de neuronas que inervan la laringe a través del nervio laríngeo recurrente se encuentra entre 140 y 163 (Hinrichsen y Ryan, 1981; Bieger y Hopkins, 1987; Flint y cols., 1991; Pascual-Font y cols., 2006b, 2011). En el resto de los animales el número de neuronas identificadas es comparativamente mayor, entre 100 y 491 en el gato, 300 y 726 en el conejo y 360 y 460 en el perro (Lawn 1966a, b; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Hisa y Sato, 1987). No obstante, la relación entre las neuronas que inervan cada músculo con respecto al número total de neuronas del ambiguo es similar para el músculo cricoaritenideo posterior en la rata cuando se compara con el de otros animales (Gacek, 1975, Hinrichsen y Ryan, 1981; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a; Portillo y Pásaro, 1988a; Flint y cols., 1991). Solo dos trabajos muestran una relación de neuronas considerablemente mayor, que puede ser debido a una contaminación del trazador a otras estructuras por la dificultad de acceso a este músculo durante la cirugía (Pásaro y cols., 1983; Berkowitz y col., 1999).

En cuanto al músculo tiroaritenideo, la media del número de neuronas contabilizadas en nuestra serie control es similar a la registrada en la mayoría de los trabajos (Hinrichsen y Ryan, 1981; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Portillo y Pásaro, 1988a; Flint y cols., 1991). No obstante, algunos de estos autores presentan conjuntamente los resultados obtenidos del trazado de este músculo con el músculo cricoaritenideo lateral a causa de la

dificultad de acceso de estos músculos (Hinrichsen y Ryan, 1981; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Flint y cols., 1991). El resto de los artículos consultados contabilizan un número mayor de neuronas, lo que puede ser debido a las diferencias entre la rata y el conejo o el perro (Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984a) o a una impregnación del trazador a otros músculos en el momento de la inyección en el músculo tiroaritenosoideo (Gacek, 1975).

La morfología de las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenosoideo posterior y tiroaritenosoideo es mayoritariamente multipolar, aunque ocasionalmente se identificó alguna de morfología fusiforme. Estos resultados son coincidentes con la descripción realizada por varios autores (Gacek, 1975; Hinrichsen y Ryan, 1981; Lobera y cols., 1981; Pásaro y cols., 1983; Yoshida y cols., 1985, 1998; Portillo y Pásaro, 1988a; Berkowitz y cols., 1999; Hayakawa y cols., 1999; Hirasugi y cols., 2007). Solo el trabajo de Davis y Nail (1984), desarrollado en gato, describe que las neuronas que inervan estos dos músculos son generalmente de morfología fusiforme. En ningún caso en nuestros trazados hemos identificado neuronas de morfología piramidal que han sido descritas por otros autores en el gato (Pásaro y cols., 1983) o el cobaya (Basterra y cols., 1987). Todo ello parece apuntar a que las diferencias en la morfología de las neuronas es interespecífica.

### **3. PROCESO DE REINERVACIÓN DE LOS MÚSCULOS CRICOARITENOIDEO POSTERIOR Y TIROARITENOIDEO A LO LARGO DEL TIEMPO**

#### **3.1 Estado de los pliegues vocales a lo largo del tiempo de supervivencia desde la lesión del nervio laríngeo recurrente.**

El análisis de los animales de los grupos experimentales muestra que el pliegue vocal ipsilateral al nervio laríngeo recurrente que ha sufrido la lesión por aplastamiento queda paralizado inmediatamente. Del mismo modo, el análisis de los animales con diferentes tiempos de supervivencia desde la lesión permite determinar que la parálisis se revierte con el paso de los días y a las 16 semanas casi todos los animales presentaban movilidad en el pliegue vocal izquierdo.

Varios trabajos han valorado la recuperación de la motilidad de los pliegues vocales paralizados como método para evaluar el proceso de reinervación de los músculos laríngeos (Marie y cols., 1989; Nahm y cols., 1993; van Sith-Bijl y Mahieu, 1998; Sanuki y cols., 2000;

Tessema y cols., 2008; McRae y cols., 2009; Miyamaru y cols., 2009; Aoyama y cols., 2010; de Corgnol y cols., 2011; Old y cols., 2011; Paviot y cols., 2011;). No obstante, solo en algunos de estos trabajos se ha practicado una lesión en el nervio laríngeo recurrente para determinar el progreso de la reinervación desde el cabo nervioso central hacia la periferia (Nahm y cols., 1993; van Sith-Bijl y Mahieu, 1998; Sanuki y cols., 2000; Tessema y cols., 2008; McRae y cols., 2009), mientras que en otros la metodología ha sido diferente y sus resultados no pueden compararse con los de la presente tesis (Marie y cols., 1989; Miyamaru y cols., 2009; Aoyama y cols., 2010; de Corgnol y cols., 2011; Old y cols., 2011; Paviot y cols., 2011).

Los resultados de la observación de la laringe en nuestros experimentos son similares a los descritos previamente en el gato (Nahm y cols., 1993), y en la rata (Sanuki y cols., 2000; Tessema y cols., 2008; McRae y cols., 2009). El estudio de Nahm y colaboradores (1993) se desarrolló en dos modelos distintos de lesión del nervio laríngeo recurrente, lesión por congelación y lesión por sección y posterior sutura de los extremos. Los pliegues vocales del grupo de crío-lesión mostraron una motilidad anómala desde el primer hasta el cuarto mes después de la lesión, recuperando por completo la motilidad del pliegue vocal a partir de ese momento. Sin embargo, el movimiento del pliegue vocal nunca se recuperó en el grupo de sección y sutura. En el trabajo de Tessema y colaboradores (2008) la motilidad del pliegue laríngeo afectado por el aplastamiento del nervio laríngeo recurrente ipsilateral se recupera tras un intervalo de 6 semanas, mientras que este periodo de recuperación se reduce a los 28 días en el trabajo de Sanuki y colaboradores (2000). No obstante, cuando la lesión del nervio es realizada por sección y sutura, transcurridos los mismos 28 días, ningún animal recuperó la motilidad de sus pliegues, observaciones que son coincidentes con las del trabajo de McRae y colaboradores (2009) en el que la supervivencia de los animales después de la lesión por sección y sutura fue de 7 semanas. Los resultados de los trabajos expuestos muestran que el proceso de recuperación de la movilidad de los pliegues laríngeos después de una lesión del nervio laríngeo recurrente depende de la severidad de la lesión. Así, la neurotmesis del nervio conduce a la parálisis permanente del pliegue vocal (Nahm y cols., 1993; van Sith-Bijl y Mahieu, 1998; Sanuki y cols., 2000; McRae y cols., 2009). Sin embargo, una axonotmesis, lo que significa una lesión del nervio más leve, provoca la inmovilización del pliegue vocal, que se va a revertir según aumenta el tiempo de recuperación (Nahm y cols., 1993; Sanuki y cols., 2000; Tessema y cols., 2008). Las diferencias en el tiempo de recuperación que encontramos entre nuestros resultados y los de otros autores que también han empleado la rata como

modelo, diferencias que no consideramos relevantes pues oscilan entre las dos y las cuatro semanas, pueden deberse a que los protocolos para realizar la axonotmesis no son iguales a los nuestros (Sanuki y cols., 2000; Tessema y cols., 2008). En nuestros experimentos la lesión fue producida por pinzas de punta fina tres veces durante 10 segundos, mientras que en el artículo de Sanuki la lesión se aplica una vez durante 5 segundos y el trabajo de Tessema y colaboradores (2008) se emplea pinza de aneurisma durante 60 segundos. Por otra parte, cuando comparamos los modelos de gato y rata el tiempo de recuperación es muy diferente, ya que en los felinos no hay recuperación hasta los 4 meses. Consideramos que el retardo observado es compatible con la diferencia de tamaño entre los nervios laríngeos recurrentes de ambas especies ya que el intervalo de lesión en el gato se realizó al doble de la distancia que se realiza en la rata (Nahm y cols., 1993).

Otra estrategia experimental para reinervar la musculatura laríngea es reconectar ciertos nervios directamente con los músculos. Uno de los modelos utilizados consiste en conectar el nervio frénico con el músculo cricoaritenideo posterior, mientras que para la musculatura aductora el nervio seleccionado es el asa cervical (Marie y cols., 1989; van Sith-Bijl y Mahieu, 1998; Miyamaru y cols., 2009; Aoyama y cols., 2010). En el trabajo de Jacobs y colaboradores (1990), en cambio, conectaron el tronco simpático cervical con el músculo cricoaritenideo posterior. La utilización de otros nervios para la reinervación de la laringe implica disfunciones en las estructuras que inervaban pretéritamente y, aunque este tipo de intervenciones pueden mejorar los movimientos de abducción y aducción durante la respiración, la función fonatoria no se recupera (Marie y cols., 1989; van Sith-Bijl y Mahieu, 1998; Miyamaru y cols., 2009; Aoyama y cols., 2010).

Más allá del modelo laríngeo, se han utilizado otros como los nervios facial, hipogloso, ciático y nervios motores oculares. La evaluación del progreso del modelo de lesión realizada en los tres primeros muestra que se puede recuperar la funcionalidad perdida en las estructuras denervadas, si bien de manera limitada (Mizumo y cols., 1980; Thomander, 1984; Aldskogius y Thomander, 1986; Fernández y cols., 1992; Streppel y cols., 1998; Asahara y cols., 1999; Guntinas-Lichius y cols., 2002, 2005; Kamijo y cols., 2003; Choi y Raisman, 2004; Franchi y cols., 2006; Katada y cols., 2006; de Ruiter y cols., 2008; Grosheva y cols., 2008). Sin embargo, en el modelo de la inervación que controla la musculatura extrínseca ocular, de mucha mayor precisión al igual que ocurre con los músculos intrínsecos laríngeos, el proceso



de lesión y regeneración del nervio oculomotor suele desembocar en una pérdida casi total de los movimientos del globo ocular (Scherer, 1986; Sibony y cols., 1986; Fernández y cols., 1992).

### **3.2 Cambios en la organización somatotópica a lo largo del tiempo de supervivencia desde la lesión del nervio laríngeo recurrente.**

Tras la inyección de trazador en los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides, en todos los grupos hemos observado neuronas localizadas en posición ipsilateral en el núcleo ambiguo, lo que descarta la posibilidad de una reinervación desde el lado contralateral. Estos resultados son coincidentes con la mayoría de los trabajos publicados (Nahm y cols., 1990, 1993; Flint y cols., 1991; Hydman y Mattsson, 2008). No hemos localizado neuronas en el núcleo dorsal del vago ni fibras en el tracto solitario al igual que la mayoría de los autores (Nahm y cols., 1990, 1993; Flint y cols., 1991; Hydman y Mattson, 2008), aunque algunos autores hayan planteado la posibilidad de que fibras autónomas puedan establecer uniones neuromusculares en los músculos denervados (Nomoto y cols., 1993; Crumley, 2000). En nuestro trabajo consideramos que ésta es una posibilidad limitada porque ha quedado demostrado que el nervio laríngeo recurrente no contiene fibras autónomas parasimpáticas (Pascual-Font y cols., 2006a, 2008, 2011).

Los resultados de nuestros experimentos muestran que, tras la lesión del nervio laríngeo recurrente, ya en la primera semana después de la lesión se pueden observar neuronas trazadas, lo que representa que los axones desde el cabo central han crecido hasta hacer sinapsis en los músculos denervados. La localización de las neuronas trazadas indican que existe una desorganización de la somatotopía de las neuronas que inervan los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides, pérdida del patrón somatotópico que no se recupera en ningún caso independientemente del tiempo transcurrido desde la lesión. En primer lugar, las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides ocupan una extensión rostro-caudal mayor que en el trazado del grupo control. Además, en posición rostral al polo rostral de la región determinada para el músculo cricoaritenoides posterior se localizan neuronas que inervan los dos músculos estudiados, si bien la mayoría corresponden al músculo cricoaritenoides posterior. Estas neuronas localizadas en esta región rostral han sido identificadas con menor frecuencia según aumenta el tiempo de recuperación. Otra

característica a destacar es que, al contrario de lo observado en el grupo control, se observa una región donde ambas poblaciones se solapan y que aparece en todos los grupos experimentales independientemente del tiempo transcurrido desde la lesión. Según pasa el tiempo, las neuronas localizadas en la extensión más rostral al músculo cricoaritenoides posterior dejan de ser trazadas desde los músculos intrínsecos inyectados. La pérdida de la somatotopía de las neuronas que inervan los músculos laríngeos, tras la lesión del nervio laríngeo recurrente, también ha sido descrita por otros autores que afirman que las neuronas que inervan los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides aparecen dispersas por la formación laringomotora del núcleo ambiguo (Nahm y cols., 1990, 1993; Flint y cols., 1991). Sin embargo, en los trabajos del primer grupo no se trazan neuronas hasta el primer mes (Nahm y cols., 1993) o el segundo (Nahm y cols., 1990) después de la lesión. Una posible explicación es que la distancia desde la lesión en el nervio laríngeo recurrente en el cobaya y el gato hasta la laringe sea mayor que en nuestros experimentos realizados en la rata, resultando determinante, una vez más, el modelo animal empleado, porque la rata es un animal más pequeño y por consiguiente la distancia desde el cabo proximal hasta los músculos intrínsecos laríngeos es menor que en el cobaya y en el gato. La velocidad de reinervación en la rata tras una lesión por aplastamiento puede alcanzar los 3 mm diarios, mientras que si es una sección sería de 2 mm diarios (Son y cols., 1996). En nuestro caso la lesión se ha practicado a 10 mm de los músculos, lo que significa que en una semana las fibras nerviosas han alcanzado los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides y por consiguiente pueden identificarse neuronas trazadas tras la inyección de CTb, mientras que, en el gato, el que la distancia sea más del doble explicaría la ausencia de neuronas trazadas hasta el primer mes. El tipo de lesión practicada es también importante porque, como se ha explicado antes, la naturaleza de la lesión afecta a la velocidad de reinervación desde el cabo proximal. La lesión por congelación o por aplastamiento que se ha realizado en el presente estudio, así como en otros trabajos (Nahm y cols., 1990, 1993), es menos severa y su velocidad puede alcanzar los 3 mm diarios (Son y cols., 1996); mientras que la sección del nervio laríngeo recurrente (Nahm y cols., 1993) es una lesión más severa (Seddon, 1942; Sunderland, 1978; Griffin y cols., 2010; Irintchev, 2011), lo que implica que la velocidad de reinervación se reduce hasta 2 mm diarios como máximo (Son y cols., 1996). Ello es debido a que la desorganización de los tubos endoneurales es mayor en una sección completa del nervio que tras el aplastamiento de éste, ya que este último tipo de lesión mantiene mejor la integridad del endoneuro (Sunderland, 1978; Griffin y cols., 2010). Además, la lesión del nervio generalmente conduce a una menor

precisión del proceso de reinervación, una pobre mielinización y a un menor tamaño de los axones cuando la lesión es por sección en comparación con el aplastamiento (Irintchev, 2011).

Por otra parte, las neuronas trazadas cranealmente al límite rostral del músculo cricoaritenideo posterior en el control, que es el mismo límite que el correspondiente a las neuronas cuyos axones son conducidos por el nervio laríngeo recurrente (Pascual-Font y cols., 2006a, 2011), podrían corresponder a neuronas que envían sus axones por el nervio laríngeo superior. Anatómicamente, se ha descrito la presencia de ramas comunicantes entre el nervio laríngeo superior y el nervio laríngeo recurrente en la rata (Bieger y Hopkins, 1987; Kobler y cols., 1994; Furusawa y cols., 1996) y el ser humano (Sañudo y cols., 1999; Maranillo y cols., 2003b). No se ha profundizado en el conocimiento de la naturaleza de las fibras presentes en estas conexiones, aunque en el artículo de Hydman y Mattsson (2008) se ha descrito la inervación dual del músculo cricoaritenideo posterior por los nervios laríngeos recurrente y superior en situación normal. Tras la sección del nervio laríngeo recurrente se produce una reinervación colateral desde el nervio laríngeo superior hacia el músculo abductor, aunque no hay reclutamiento de nuevas neuronas, sino un brote axonal intramuscular de las neuronas del nervio laríngeo superior que inervan el músculo cricoaritenideo posterior (Hydman y Mattsson, 2008). Tampoco puede descartarse la posibilidad de que esta extensión rostral sea debida a un brote axonal desde los terminales nerviosos que inervan el músculo cricotiroides o la musculatura faríngea hacia la musculatura denervada cuyos cuerpos neuronales se localizan en el núcleo ambiguo (Lawn 1966ab; Yoshida y cols., 1980, 1981, 1987; Davis y Nail, 1984; Hisa y cols., 1984b; Hisa y Sato, 1987). No obstante, la existencia de estas neuronas en posición rostral al polo rostral del músculo cricoaritenideo posterior no ha sido descrita por ninguno de los autores consultados (Nahm y cols., 1990, 1993; Flint y cols., 1991). En alguno de estos artículos se ha realizado el trazado de los músculos intrínsecos laríngeos varias semanas después de ser efectuada la lesión (Flint y cols., 1991), lo que puede explicar la ausencia de estas neuronas en la localización más rostral que nosotros si hemos identificado en las primeras semanas. Sin embargo, otro grupo de autores que si han establecido los cambios en la somatotopía por medio de una serie temporal de reinervación del nervio laríngeo recurrente (Nahm y cols., 1990, 1993) no han descrito la presencia de neuronas en situación más rostral a la determinada en el grupo control. No obstante, los

modelos animales empleados en estos trabajos son diferentes a la rata, lo que podría explicar diferencias en el proceso de reinervación entre las diferentes especies.

Por último, hemos observado en nuestros grupos experimentales que el territorio de solapamiento tras el trazado de los músculos cricoaritenosoide posterior y tiroaritenosoide se mantiene desde la primera hasta la decimosexta semana. En este sentido, nuestros resultados son similares a los presentados por el resto de los autores que han realizado la lesión del nervio laríngeo recurrente. Estos resultados pueden interpretarse como una desorganización de la somatotopía de la musculatura laríngea en el núcleo ambiguo (Nahm y cols., 1990, 1993; Flint y cols., 1991).

Cuando comparamos los resultados de nuestro estudio en el nervio laríngeo recurrente con trabajos en los que se lesiona otros nervios, también se ha observado una desorganización de la somatotopía en los núcleos del nervio facial (Thomander, 1984; Aldskogius y Thomander, 1986; Fernández y cols., 1992; Streppel y cols., 1998; Asahara y cols., 1999; Guntinas-Lichius y cols., 2002, 2005; Kamijo y cols., 2003; Choi y Raisman, 2004; Franchi y cols., 2006; Grosheva y cols., 2008), el nervio hipogloso (Mizumo y cols., 1980), los nervios que gobiernan la musculatura extraocular (Scherer, 1986; Sibony y cols., 1986; Fernández y cols., 1992) y el nervio ciático (Fernández y cols., 1992; Katada y cols., 2006; de Ruiter y cols., 2008). No obstante, al igual que ocurre en nuestros experimentos, con el tiempo se recupera la funcionalidad de los músculos que inervan, lo que parece indicar que existe una cierta plasticidad neuronal en el sistema nervioso central en los núcleos subcorticales, que pueden adaptarse, aunque sea parcialmente, a una nueva organización después de una lesión en cualquier nervio (Mizumo y cols., 1980; Thomander, 1984; Sibony y cols., 1986; Asahara y cols., 1999; Guntinas-Lichius y cols., 2002, 2005; Grosheva y cols., 2008).

### **3.3 Cambios en el número de neuronas identificadas a lo largo del tiempo de supervivencia desde la lesión del nervio laríngeo recurrente.**

El trazado de los músculos cricoaritenosoide posterior y tiroaritenosoide en los grupos experimentales ha mostrado que el número de neuronas trazadas es muy variable entre los mismos animales de un mismo grupo y entre los distintos grupos experimentales en función del tiempo de supervivencia. La primera semana post-lesión, el número de neuronas que

inervan el músculo cricoaritenoides posterior es considerablemente mayor que el del grupo control, mientras que el número de neuronas que inervan el músculo tiroaritenoides es inferior. En las semanas siguientes el número de neuronas que inervan los citados músculos muestra una tendencia a igualar el número de los animales control, de manera que a las 12 y 16 semanas después de la lesión el número de neuronas es semejante al identificado para estos músculos en los animales con el nervio no afectado.

Los estudios que realizan el trazado de los músculos intrínsecos laríngeos después de una lesión en el nervio laríngeo recurrente presentan resultados, en relación al número de neuronas, que no son coincidentes a los nuestros (Nahm y cols., 1990, 1993; Flint y cols., 1991). En primer lugar, el trabajo de Nahm y colaboradores (1990), realizado en el cobaya, revela que tras la lesión por congelación del nervio laríngeo recurrente el número de neuronas que inervan el músculo cricoaritenoides posterior aumenta con el tiempo, aunque no alcanza al registrado antes de la lesión. En el siguiente estudio publicado por el mismo grupo (Nahm y cols., 1993) se lesionó el nervio laríngeo recurrente del gato por medio de dos técnicas. La primera de ellas consiste en la lesión por sección y posterior sutura del nervio cuyos resultados se pueden resumir en un aumento de las neuronas que inervan el músculo cricoaritenoides posterior a lo largo del tiempo, al igual que ocurre en la lesión por congelación del nervio laríngeo recurrente realizada por el mismo grupo de investigación sobre el cobaya (Nahm y cols., 1990). Sin embargo, en el grupo de animales en los que se ejecutó la lesión por congelación del nervio presentaron un comportamiento similar al observado por nosotros, es decir, una gran variabilidad del número de neuronas identificadas con tendencia a aproximarse al número registrado en el grupo control según progresa el tiempo de recuperación. En otro sentido, los resultados del artículo de Flint y colaboradores (1991) muestran que la sección y sutura del nervio laríngeo recurrente, realizado en la rata al igual que nuestro trabajo, conduce a una reducción del número de neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides a las 15 semanas de haber sido realizada la lesión cuando se compara con las obtenidas en los animales control.

En nuestros experimentos, que el número medio de neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior sea mayor que el obtenido para el músculo tiroaritenoides puede ser debido a la reinervación colateral desde el nervio laríngeo superior (Hydman y Mattsson, 2008) y a que la rama que inerva el músculo cricoaritenoides posterior es la primera en

desprenderse del nervio laríngeo recurrente, lo que facilita que éste pueda ser el primer músculo en ser reinervado (Crumley y McCabe, 1982; Crumley, 2000). Por otra parte, la preferencia de la reinervación del músculo cricoararitenideo posterior frente a la musculatura aductora también explicaría que en las ratas que mantienen el pliegue vocal izquierdo paralizado se haya observado un cambio de la posición del pliegue de medial a paramedial en más animales (4 animales de los 23 totales con el pliegue paralizado) que de posición paramedial a medial (1 animal).

La diferencia en el número de neuronas contabilizadas que encontramos en el trabajo desarrollado en el cobaya puede ser debida a que el proceso de reinervación sea diferente en comparación con la rata (Nahm y cols., 1990). En cambio, la discrepancia de nuestros resultados con respecto a los trabajos de Flint y colaboradores (1991) y Nahm y colaboradores (1993) es, probablemente, debido al tipo de lesión realizada en el nervio laríngeo recurrente, que en estos dos casos es por sección y sutura y los resultados que obtienen son semejantes a otro trabajo realizado en nuestro laboratorio también mediante la sección del nervio laríngeo recurrente (Pascual-Font y cols., 2008). En un estudio previo realizado por Flint y colaboradores (1991), se describió la posibilidad de que exista una muerte neuronal de una población específica, lo que explicaría el menor número de neuronas encontradas tras trazar un músculo que tras trazar otro, aunque esta posibilidad no se comprobó empíricamente (Flint y cols., 1991). Experimentos de lesión sobre otros nervios demuestran que efectivamente la lesión intracraneal del nervio facial (Mattsson y cols., 1998; Dai y cols., 2000) y del nervio troclear (Murphy y cols., 1990) conduce a que parte de la población de neuronas lesionadas experimenten muerte neuronal. Sin embargo, Hydman y colaboradores (2005) han demostrado que no existe muerte neuronal durante el primer mes, que es el periodo clave en el que se puede producir la apoptosis por el daño en el nervio (Sunderland, 1978), cuando la sección del nervio laríngeo recurrente se realiza a la altura del séptimo anillo traqueal.

En los modelos de lesión de otros nervios diferentes al laríngeo recurrente, el número de neuronas identificadas a los diferentes tiempos después de la lesión igualmente varía a lo largo del proceso de reinervación, si bien también hay una tendencia a recuperar el número de neuronas contabilizadas en los grupos control, de manera muy similar a la que hemos descrito en nuestros propios experimentos (Mizumo y cols., 1980; Thomander, 1984; Scherer, 1986;

Fernández y cols., 1992; Streppel y cols., 1998; Choi y cols., 2002; Guntinas-Lichius y cols., 2002, 2005; Kamijo y cols., 2003; de Ruiter y cols., 2008; Grosheva y cols., 2008). Otros autores han contabilizado un número sensiblemente inferior al del grupo control, lo que podría explicarse por la incapacidad de muchos axones en regeneración para traspasar la cicatriz en el nervio desde el cabo central al periférico (Aldskogius y Thomander, 1986; Sibony y cols., 1986; Franchi y cols., 2006; Katada y cols., 2006). Por otra parte, algunos autores han determinado que tras la lesión de un nervio se produce la generación de brotes axonales desde el extremo central del nervio lesionado y que ésta es la causa de la identificación de un número mayor de neuronas desde cada músculo con respecto a los animales no lesionados ya que una misma neurona puede, en el proceso de reinervación, hacer sinapsis en las uniones neuromusculares de dos o más músculos (Guntinas-Lichius y cols., 2005; Grosheva y cols., 2008).

## **CONCLUSIONES**



1. Las neuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo se distribuyen somatotópicamente en el núcleo ambiguo.
2. La somatotopía de las neuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo sigue un eje rostrocaudal en el núcleo ambiguo.
3. Las neuronas que inervan el músculo cricoaritenideo posterior se disponen en posición rostral a las motoneuronas que inervan el músculo tiroaritenideo.
4. El número medio de neuronas que inerva el músculo cricoaritenideo posterior es 41, mientras que el número medio para el músculo tiroaritenideo es 31.
5. Para cada uno de los dos músculos estudiados, el 50% de las neuronas trazadas se agrupa en un segmento rostrocaudal de 350 micrómetros de longitud ubicado aproximadamente en el centro de la región de distribución de todas las neuronas trazadas.
6. Entre las motoneuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo no existe una región de solapamiento.
7. La lesión por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente acarrea la pérdida de la organización somatotópica de las neuronas trazadas desde los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo.
8. La somatotopía perdida por la lesión por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente no se recupera en ninguno de los tiempos de supervivencia post-lesión estudiados.
9. La lesión por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente modifica el número de neuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo, con una variación considerable a largo del tiempo de supervivencia post-lesión. Sin embargo, hay una tendencia, a medida que aumenta el tiempo de supervivencia post-lesión, a que el número de neuronas trazadas se aproxime a la media observada en el grupo control.

10. La lesión por aplastamiento del nervio laríngeo recurrente provoca la parálisis del pliegue vocal ipsilateral.

11. Los pliegues vocales paralizados tienden a recuperar la motilidad con el aumento del tiempo de supervivencia post-lesión.

12. La recuperación de la movilidad del pliegue vocal no se relaciona con el restablecimiento de la somatotopía de las neuronas que reinervan los músculos intrínsecos laríngeos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Aldskogius H, Thomander L. Selective reinnervation of somatotopically appropriate muscles alter facial nerve transection and regeneration in the neonatal rat. *Brain Research* 1986; 375: 126-134.
- Altschuller SM, Bao X, Bieger D, Hopkins DA, Miselis RR. Vicerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat. Sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *The Journal of Comparative Neurology* 1989; 283: 248-268.
- Aoyama T, Kumai Y, Yumoto E, Ito T, Miyamaru S. Effects of nerve-muscle pedicle on immobile rat vocal folds in the presence of partial innervation. *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology* 2010; 119: 839-829.
- Asahara T, Lin M, Kumazawa Y, Takeo K, Akamine T, Nishimura Y, Kayahara T, Yamamoto T. Long-term observation on the changes of somatotopy in the facial nucleus alter nerve suture in the cat: Morphological studies using retrograde labeling. *Brain Research Bulletin* 1999; 49: 195-202.
- Basterra J, Chumbley C, Dilly PN. Topographic distribution of laryngeal motor neurons in the nucleus ambiguus of the guinea pig studied by horseradish peroxidase (HRP) technique. *Acta Oto-laryngologica. Supplementum* 1987; 103: 105-110.
- Benjamin B. Vocal cord paralysis, synkinesis and vocal fold motion impairment. *ANZ Journal of Surgery* 2003; 74: 784-786.
- Berkowitz RG, Sun Q, Chalmers J, Pilowsky P. Identification of posterior cricoarytenoid motoneurons in the rat. *Annals of otology, rhinology and laryngology* 1999; 108: 1033-1041.
- Berthold CH, Fraher JP, King RHM, Rydmark M. Microscopy Anatomy of the Peripheral Nervous System. En: Dyck PJ, Thomas PK, editores. *Peripheral Neuropathy*. 4 ed. Philadelphia: Ed Elsevier Saunders; 2005. p 35-92.
- Bieger D, Hopkins DA. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *The journal of comparative neurology* 1987; 262, 546-562.
- Birchall MA, Lorenz RR, Berke GS, Genden EM, Haughey BH, Siemionow M, Strome M. Laryngeal transplantation in 2005: A review. *American Journal of Transplantation* 2006; 6: 20-26.
- Borley NR. Abdomen and pelvis: overview and surface anatomy. En: Standring S, editora. *Gray's Anatomy*. 40 ed. London: Churchill Livingstone; 2008. p. 1041-1054.
- Brushart TME. Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *The Journal of Neuroscience* 1988; 8: 1026-1031.
- Brushart TME. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *The Journal of Neuroscience* 1993; 13: 2730-2738.
- Bunzl-Federn 1899. Citado por Lawn 1966a.

- Burns TM. Mechanism of acute and chronic compression neuropathy. En: Dyck PJ, Thomas PK, editores. *Peripheral Neuropathy* 4 ed. Philadelphia: Ed Elsevier Saunders; 2005. p. 1391-1402.
- Choi D, Raisman G, Phil D. Somatotopic organization of the facial nucleus is disrupted after lesioning and regeneration of the facial nerve: the histological representation of synkinesis. *Neurosurgery* 2002; 50: 355-363.
- Choi D, Raisman G. After facial nerve damage, regenerating axons become aberrant throughout the length of the nerve and not only at the site of lesion: an experimental study. *British Journal of Neurosurgery* 2004; 18: 45-48.
- Conte WL, Kamishina H, Reed RL. The efficacy of the fluorescent conjugates of cholera toxin subunit B for multiple retrograde tract tracing in the central nervous system. *Brain structure and function* 2009; 213: 367-373.
- Cooper MH. Anatomy of the larynx. En: Blitzler A, Brin M, Ramig L, editores. *Neurologic disorders of the larynx*. 2 ed. Nueva York: Ed Thieme; 2009. p. 3-9.
- Crumley RL, McCabe BF. Regeneration of the recurrent laryngeal nerve. *Otolaryngology Head and Neck Surgery* 1982; 90: 442-447.
- Crumley RL. Laryngeal synkinesis revisited. *Annals of otology, rhinology and laryngology* 2000; 109: 365-371.
- Dai CF, Kanoh N, Li KY, Wang Z. Study on facial motoneuron death after proximal or distal facial nerve transection. *The American Journal of Otology* 2000; 21: 115-118.
- Davis PJ, Nail BS. On the location and size of laryngeal motoneurons in the cat and rabbit. *The journal of comparative neurology* 1984; 20: 13-32.
- de Corgnol AC, Guérout N, Duclos C, Vérin E, Marie JP. Olfactory ensheathing cells in a rat model of laryngeal reinnervation. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology* 2011; 120: 273-280.
- de Haan L, Hirst T. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). *Molecular Membrane Biology* 2004; 21: 77-92.
- de Ruiter G, Malessy MJA, Alaid AO, Spinner RJ, Engelstad JK, Sorenson EJ, Kaufman KR, Dyck PJ, Windebank AJ. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. *Experimental Neurology* 2008; 211: 339-350.
- Dederen PJWC, Gribnau AAM, Curfs MHJM. Retrograde neuronal tracing with cholera toxin B subunit: comparison of three different visualization methods. *The Histochemical Journal* 1994; 26: 856-862.
- Fernandez E, Pallini R, Marchese E, Lauretti L, Bozzini V, Sbriccoli A. Reconstruction of peripheral nerves: the phenomenon of bilateral reinnervation of muscles originally innervated by unilateral motoneurons. *Neurosurgery* 1992; 30: 364-369.

- Fink BR, Demarest RJ. Laryngeal biomechanics. Cambridge: Ed. Harvard University Press; 1978.
- Flint PW, Downs DH, Coltrera MD. Laryngeal synkinesis following reinnervation in the rat. Neuroanatomic and physiologic study using retrograde fluorescent tracers and electromyography. *Annals of otology, rhinology and laryngology* 1991; 100: 797-806.
- Flumerfelt BA, Kierman JP, Krcek JP, Sholdice J. Reinnervation of skeletal muscle in the tongue by preganglionic parasympathetic vagal neurons. *Journal of Anatomy* 1986; 146: 117-130.
- Franchi G, Maggiolini E, Muzzioli V, Guandalini P. The vibrissal motor output following severing and repair of the facial nerve in the newborn rat reorganises less than in the adult. *European Journal of Neuroscience* 2006; 23: 1547-1558.
- Fritzsche B. Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *Journal of Neuroscience Methods*. 1993; 50: 95-103.
- Furusawa K, Yasuda K, Okuda D, Tanaka M, Yamaoka. Central distribution and peripheral functional properties of afferent components of the superior laryngeal nerve: morphological and electrophysiological studies in the rat. *The journal of comparative neurology* 1996; 375:147-156.
- Gacek RR. Localization of laryngeal motor neurons in the kitten. *Laryngoscope* 1975; 85: 1841-1861.
- Gemmell CG. Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. *Journal of Medical Microbiology* 1984; 17: 217-235.
- Griffin JW, Pan B, Polley MA, Hoffman PN, Farah M. Measuring nerve regeneration in the mouse. *Experimental Neurology* 2010; 223: 60-71.
- Grkovic I, Fernández K, McAllen RM. Misidentification of cardiac vagal preganglionic neurons after injections of retrograde tracer into the pericardial space in the rat. *Cell and Tissue Research* 2005; 321: 335-340.
- Grosheva M, Guntinas-Lichius O, Angelova SK, Kuerten S, Alvanou A, Streppel M, Skouras E, Sinis N, Pavlov S, Angelov DN. Local stabilization of microtubule assembly improves recovery of facial nerve function after repair. *Experimental Neurology* 2008; 209: 131-144.
- Guntinas-Lichius O, Wewetzer K, Tomov TL, Azzolin N, Kazemi S, Streppel M, Neiss WF, Angelov DN. Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22: 7121-7131.
- Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss WF, Angelov DN. Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. *European Journal of Neuroscience* 2005; 21: 391-402.

- Hall, S. Mechanism of Repair after Traumatic Injury. En: Dyck PJ, Thomas PK, editores. *Peripheral Neuropathy*. 4 ed. Philadelphia: Ed Elsevier Saunders; 2005. p. 1403-1435.
- Hamilton RB, Norgren R. Central projection of gustatory nerves in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 1984; 222: 560-577.
- Hayakawa T, Qi Zheng J, Maeda S, Ito H, Seki M, Yajima Y. Synaptology and ultrastructural characteristics of laryngeal cricothyroid and posterior cricoarytenoid motoneurons in the nucleus ambiguus of the rat. *Anatomy and Embriology* 1999; 200:301-311.
- Hinrichsen CFL, Ryan T. Localization of laryngeal motoneurons in the rat: morphologic evidence for dual innervation? *Experimental Neurology* 1981; 74: 341-355.
- Hinrichsen CFL y Ryan T. The size of motor units in laryngeal muscles of the rat. *Experimentia* 1982; 38: 360-361.
- Hirasugi K, Hisa Y, Setsu T, Terashima T. Ambiguous motoneurons innervating laryngeal and esophageal muscles are malpositioned in the Reelin-deficient mutant rat, Shaking Rat Kawasaki. *Acta Oto-laryngologica* 2007; 127: 213-220.
- Hisa Y, Matsui T, Sato F, Matsuura T, Fukui K, Tange A, Ibata Y. The localization of the motor neurons innervating the cricothyroid muscle in the adult dog by the fluorescent retrograde axonal labeling technique. *Archives of Oto-rhino-laryngology* 1982; 234 (1): 33-36.
- Hisa Y, Sato F, Fukui K, Ibata Y, Mizukoshi O. Nucleus ambiguus motoneurons innervating the canine intrinsic laryngeal muscles by the fluorescent labelling technique. *Experimental Neurology* 1984 a; 84 441-449.
- Hisa Y, Sato F, Suzuki Y, Yanohara K, Hyuga M, Mizukoshi O. The localization of motoneurons innervating the canine pharyngeal constrictor muscles in the posterior larynx by the fluorescent double-labelling technique. *Archives of Oto-rhino-laryngology* 1984 b; 241: 83-87.
- Hisa Y, Sato F. Localization of the motoneurons innervating the canine larynx by the fluorescent labelling technique. En: Hirano M, Kirchner JA, Bless DM, editores. *Neurolaryngology recent advances*. Boston: Collage-Hill Press; 1987. p. 19-26.
- Hopkins D. Ultrastructure and synaptology of the nucleus ambiguus in the rat: the compact formation. *The Journal of Comparative Neurology* 1995; 360:705-725.
- Hydman J, Svensson M, Kuylenstierna R, Ohlsson M, Mattsson P. Neuronal survival and glial reactions alter recurrent laryngeal nerve resection in the rat. *Laryngoscope* 2005; 115: 619-624.
- Hydman J, Mattsson P. Collateral reinnervation by the superior laryngeal nerve alter recurrent laryngeal nerve injury. *Muscle & Nerve* 2008; 38: 1280-1289.

- Hydman J, Mattsson P. Preserved regeneration and functional recovery of the injured recurrent laryngeal nerve after secondary surgical repair in adult rats. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology* 2009; 118: 73-80.
- Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, binding strategies and effect evaluation. *Biomaterials* 2004; 25: 1583-1592.
- Inagi K, Ford CN, Rodríguez AA, Schulz E, Bless DM, Heisey DM. Efficacy of repeated botulinum toxin injections as a function of timing. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* 1997; 106: 1012-1019.
- Inagi K, Schultz E, Ford C. An anatomic study of the rat larynx: Establishing the rat model for neuromuscular function. *Otolaryngology. Head and neck surgery* 1998; 118: 74-81.
- Irintchev A. Potentials and limitations of peripheral nerve injury models in rodents with particular reference to the femoral nerve. *Annals of Anatomy* 2011; 193: 276-285.
- Jacobs IN, Sanders I, Wu BL, Biller HF. Reinnervation of the canine posterior cricoarytenoid muscle with sympathetic preganglionic neurons. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* 1990; 90: 167-174.
- Kalia M, Mesulam M. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *The journal of comparative neurology* 1980a; 193:435-465.
- Kalia M, Mesulam M. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac and gastrointestinal branches. *The journal of comparative neurology* 1980b; 193: 467-508.
- Kalia M, Sullivan JM. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *The journal of comparative neurology* 1982; 211: 248-65.
- Kamijo Y, Koyama J, Oikawa S, Koizumi Y, Yokouchi K, Fukushima N. Regenerative process of the facial nerve: rate of regeneration of fibers and their bifurcations. *Neuroscience Research* 2003; 46: 135-143.
- Katada A, Vos JD, Swelstad BB, Zealer DL. A sequential double labeling technique for studying changes in motoneuronal projections to muscle following nerve injury and reinnervation. *Journal of Neuroscience Methods* 2006; 155: 20-27.
- Khan AA y Zhang M. Neck. En: Standring S, editora. Gray's Anatomy 40 ed. Londres: Churchill Livingstone; 2008. p. 435-466..
- Kitamura S, Okubo J, Nishiguchi T, Chen Kai-Li, Sakai A. Localization of origin cells of the superior and inferior laryngeal nerves in the nucleus ambiguus: an HRP study in the rabbit. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 1985; 62: 161-172.
- Kitamura S, Okubo J, Ogata K, Sakai A. Fibers supplying the laryngeal musculature in the cranial root of the rabbit accessory nerve: nucleus of origin, peripheral course, and innervated muscles. *Experimental neurology* 1987; 97: 592-606.



- Kobler JB, Datta S, Goyal RK, Benecchi EJ. Innervation of the larynx, pharynx and upper esophageal sphincter of the rat. *The journal of comparative neurology* 1994; 349: 129-147.
- Kosaka, 1909. Citado por Bieger y Hopkins 1987.
- Krause, 1876. Citado por Molhant M 1912.
- Lawn AM. The localization, in the nucleus ambiguus of the rabbit, of the cells of origin of motor nerve fibers in the glossopharyngeal nerve and various branches of the vagus nerve by means of retrograde degeneration. *The Journal of Comparative Neurology* 1966a; 127: 293-306.
- Lawn AM. The nucleus ambiguus of the rabbit. *The Journal of Comparative Neurology* 1966b; 127: 307-320.
- Lee J. Brain stem. En: Standring S, editores. *Gray's Anatomy*. 40 ed. Londres: Churchill Livingstone; 2008. p. 275-296.
- León X, Pujol A, López M, García J, Pons G, Sañudo JR, Masià J, Quer M. Transplante de la laringe: ¿una opción terapéutica para el siglo XXI? Revisión de la literatura. *Acta Otorrinolaringológica Española* 2008; 59: 127-138.
- Li ZB, Lehar M, Nakagawa H, Foon Yoong Hoh J, Flint PW. Differential expression of myosin heavy chain isoforms between abductor and adductor muscles in the human larynx. *Otolaryngology. Head and neck surgery* 2004; 130: 217-222.
- Lobera R, Pásaro R, Gonzalez-Barón S, Delgado-García JM. A morphological study of ambiguous nucleus in the rat and cat. *Neuroscience letters* 1981; 23: 125-130.
- Lorenz RR, Dan O, Fritz MA, Nelson M, Strome M. Rat laryngeal transplant model: technical advancements and redefined rejection grading system. *Annals of otology, rhinology and laryngology* 2002; 111:1120-1127.
- Maranillo E, León X, Ibañez M, Orús C, Quer M, Sañudo JR. Variability of the nerve supply patterns of the human posterior cricoarytenoid muscle. *Laryngoscope* 2003 a; 113: 602-606.
- Maranillo E, León X, Quer M, Orús C, Sañudo JR. Is the external laryngeal nerve an exclusively motor nerve? The cricothyroid connection branch. *Laryngoscope* 2003 b; 113: 525-529.
- Maranillo E, Leon X, Orus C, Quer M, Sañudo JR. Variability in nerve patterns of the adductor muscle group supplied by recurrent laryngeal nerve. *Laryngoscope* 2005; 115: 358-362.
- Marie JP, Dehesdin D, Ducastelle T, Senant J. Selective reinnervation of the abductor and adductor muscles of the canine larynx after recurrent nerve paralysis. *Annals of otology, rhinology and laryngology* 1989; 98: 530-536.

- Marinesco y Parhon, 1907. Citado por Bieger y Hopkins 1987.
- Martin-Oviedo C, Marañillo E, Lowy-Benoliel A, Pascual-Font A, Martinez-Guirado T, Rodríguez-Niedenführ M, Sañudo JR, Scola B, Vázquez T. Functional role of human laryngeal nerve connections. *Laryngoscope* 2011. En prensa.
- Mattsson P, Meijer B, Svensson M. Extensive neuronal cell death following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *Brain Research Bulletin* 1998; 49: 333-341.
- McHanwell S, Biscoe TJ. The localization of motoneurons supplying the hindlimb of the mouse. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B* 1981a; 293: 477-508.
- McHanwell S, Biscoe TJ. The sizes of motoneurons supplying the hindlimb of the mouse. *Proceedings of the Royal Society B* 1981b; 213: 201-216.
- McHanwell S. The larynx. En: Standring S, editores. Gray's Anatomy. 40ed. Londres: Churchill Livingstone; 2008. p. 577-594.
- McRae BR, Kincaid JC, Illing EA, Hiatt KK, Hawkins JF, Halum SL. Local neurotoxins for prevention of laryngeal synkinesis after recurrent laryngeal nerve injury. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology* 2009; 118: 887-893.
- Miyamaru S, Kumai Y, Ito T, Sanuki T, Yumoto E. Nerve-muscle pedicle implantation facilitates re-innervation of long-term denervated thyroarytenoid muscle in rats. *Acta Oto-laryngologica* 2009; 129: 1486-1492.
- Mizumo N, Uemura-Sumi M, Matsuda K, Takeuchi Y, Kume M, Matsushima R. Non-selective distribution of hypoglossal nerve fibers after section and resuture: a horseradish peroxidase study in the cat. *Neuroscience letters* 1980; 19: 33-37.
- Molhant M. Le nerf vague. Etude anatomique et expérimentale. Deuxième partie. Le noyau ambigu; les connexions anatomiques et la valeur fonctionnelle du noyau central du vague et du noyau ambigu. *Névrose* 1912; 13: 9-316.
- Murphy EH, Brown J, Iannuzzelli PG, Baker R. Regeneration and soma size changes following axotomy of the trochlear nerve. *The Journal of Comparative Neurology* 1990; 295: 685-697.
- Nahm I, Shin T, Chiba T. Regeneration of the recurrent laryngeal nerve in the guinea pig. Reorganization of motoneurons after freezing injury. *American Journal of Otolaryngology* 1990; 11: 90-98.
- Nahm I, Shin T, Watanabe H, Maeyama T. Misdirected regeneration of injured recurrent laryngeal nerve in the cat. *American Journal of Otolaryngology* 1993; 14: 43-48.

- Niedringhaus M, Jackson PG, Pearson R, Shi M, Dretchen K, Gillis RA, Sahibzada N. Brainstem sites controlling the lower esophageal sphincter and crural diaphragm in the ferret: A neuroanatomical study. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2008; 144: 50-60.
- Nomoto M, Yoshihara T, Kanda T, Konno A, Kaneko T. Misdirected reinnervation in the feline intrinsic laryngeal muscles after long-term denervation. *Acta Otolaryngologica. Supplementum* 1993; 506: 71-74.
- Nosaka S, Yamamoto T, Yasunaga K. Localization of vagal cardioinhibitory preganglionic neurons with rat brain stem. *The journal of comparative neurology* 1979; 186: 79-92.
- Núñez-Abades PA, Pásaro R, Bianchi AL. Study of the topographical distribution of different populations of motoneurons within rat's nucleus ambiguus, by means of four different fluorochromes. *Neuroscience Letters* 1992; 135: 103-107.
- Okubo J, Kitamura S, Ogata, K, Sakai A. Localization of rabbit laryngeal motoneurons in the nucleus ambiguus. *Experimental Neurology* 1987; 96: 528-539.
- Old MO, Sang SO, Feldman E, Norman D, Hogikyan ND. Novel model to assess laryngeal function, innervation, and reinnervation. *Annals of Otolaryngology & Laryngology* 2011; 120: 331-338.
- Pásaro R, Lobera S, González-Barón S, Delgado-García JM. Localización de las motoneuronas de los músculos intrínsecos de la laringe en la rata. *Revista Española de Fisiología* 1981; 37: 317-322.
- Pásaro R, Lobera B, González-Barón S, Delgado-García JM. Cytoarchitectonic organization of laryngeal motoneurons within the nucleus ambiguus of the cat. *Experimental Neurology* 1983; 82: 623-634.
- Pascual-Font A, Marañillo E, Merchán A, Vázquez T, Sañudo JR, Valderrama-Canales FJ. Central projections of the rat recurrent laryngeal nerve. *Acta Otorrinolaringológica Española* 2006a; 57: 253-256.
- Pascual-Font A, Marañillo E, Merchán A, Vázquez T, Sañudo JR, Valderrama-Canales FJ. Central projections of the rat superior laryngeal nerve. *Acta Otorrinolaringológica Española* 2006b; 57: 295-299.
- Pascual-Font A, Marañillo E, Vázquez T, Sañudo JR, Valderrama-Canales FJ. On the number and morphometrical parameters of the nucleus ambiguous neurons after the injury and regeneration of the recurrent laryngeal nerve in the rat. *Acta Otorrinolaringológica Española* 2008; 59: 163-169.
- Pascual-Font A, Hernández-Morato I, McHanwell S, Vázquez T, Marañillo E, Sañudo J, Valderrama-Canales FJ. The central projections of the laryngeal nerves in the rat. *Journal of Anatomy* 2011; 219: 217-228.

- Patrickson J.W., Smith T.E., Zhou J.W. Motor neurons of the laryngeal nerves. *The Anatomical Record* 1991; 230: 551-556.
- Paviot A, Guérout N, Bon-Mardion N, Duclos C, Jean L, Boyer O, Marie JP. Efficiency of laryngeal motor nerve repair is greater with bulbar than with mucosal olfactory ensheathing cells. *Neurobiology of Disease* 2011; 41: 688-694.
- Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5ed. Londres: Elsevier Academic Press; 2005.
- Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 1998; 82: 443-468.
- Portillo F, Pásaro R. Location of motoneurons supplying the intrinsic laryngeal muscles of rats. Horseradish peroxidase and fluorescence double-labeling study. *Brain, Behavior and Evolution* 1988a; 32: 220-225.
- Portillo F, Pásaro R. Location of bulbospinal neurons and or laryngeal motoneurons within the nucleus ambiguus of the rat and cat by means of retrograde fluorescent labelling. *Journal of Anatomy* 1988b; 159: 11-18
- Ramón y Cajal S. Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des vertébrés. Malaine, París; 1909.
- Ramon y Cajal, S. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Madrid; 1914.
- Ranson RN, Butler PJ, Taylor EW. Studies on nerves of the upper respiratory tract in the ferret and the mink. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1995; 52: 1-16.
- Redett R, Jari R, Crawford T, Chen YG, Rohde C, Brushart T. Peripheral pathways regulate motoneuron collateral dynamics. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25: 9406-9412.
- Rhee HS, Lucas CA, Hoh JF. Fiber types in rat laryngeal muscles and their transformations after denervation and reinnervation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2004; 52: 581-590.
- Robinson y Madison. Developmentally regulated changes in femoral nerve regeneration in the mouse and rat. *Experimental Neurology* 2006; 197: 341-346.
- Sanuki T, Yumoto E, Komori M, Hyodo M. Expression of fibroblast growth factor-2 in the nucleus ambiguus following recurrent laryngeal nerve injury in the rat. *Laryngoscope* 2000; 110: 2128-2134.

- Sañudo JR, Maranillo E, León X, Mirapeix RM, Orús C, Quer M. An anatomical study of anastomoses between the laryngeal nerves. *Laryngoscope* 1999; 109: 983-987.
- Saper CB. Brain stem, reflexive behaviour and the cranial nerves. En Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editores. Principles of neural science. 5 ed. Nueva York: Mc Graw Hill; 2000. p. 873-888.
- Sasaki CT. Anatomy and development and physiology of the larynx. [Online]. Raj Goyal and Reza Shaker: GI Motility online. Enlace: <http://www.nature.com/gimo/contents/pt1/full/gimo7.html> [Publicado el 19 de mayo de 2006].
- Saxon D, Robertson G, Hopkins D. Ultrastructure and sinaptology of the nucleus ambiguus in the rat: the semicompact and loose formations. *The Journal of Comparative Neurology* 1996; 375: 109-127.
- Scherer SS. Reinnervation of the extraocular muscles in goldfish is nonselective. *The Journal of Neuroscience* 1986; 6: 764-773.
- Schweizer H, Ruebsamen R, Ruehle C. Localization of brain stem motoneurons innervating the laryngeal muscles in the rufous horseshoe bat, *Rhinolophus rouxi*. *Brain Research* 1981; 230: 41-50.
- Seddon HJ. A classification of nerve injuries. *British Medical Journal* 1942; 2: 237-239.
- Shiotani A, Nakagawa H, Flint PW. Modulation of myosin heavy chains in rat laryngeal muscle. *Laryngoscope* 2001; 111: 472-477.
- Sibony PA, Evinger C, Lessell S. retrograde horseradish peroxidase transport after oculomotor nerve injury. *Investigate ophthalmology & visual science* 1986; 27: 975-980.
- Skouras E, Ozsoy U, Sarikcioglu L, Angelov DN. Intrinsic and therapeutic factors determining the recovery of motor function after peripheral nerve transection. *Annals of Anatomy* 2011; 193: 286-303.
- Smith G. Structure of the normal rat larynx. *Laboratory animals* 1977; 11: 223-228.
- Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends in Neuroscience* 1996; 19: 280-285.
- Streppel M, Angelov DN, Guntinas-Lichius O, Hilgers RD, Rosenblatt JD, Stennert E, Neiss WF. Slow axonal regrowth but extrem hyperinnervation of target muscle after suture of the facial nerve in aged rats. *Neurobiology of Aging* 1998; 19: 83-88.

- Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, Yetman R, Eliachar I, Mayes J. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *The New England of Journal of Medicine* 2001; 344: 1676-1679.
- Sunderland, S. Nerves and Nerve Injuries. 2 ed. Londres: Churchill Livingstone; 1978.
- Suzuki M, Kirchner JA. Afferent nerve fibers in the external branch of the superior laryngeal nerve in the cat. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology* 1968; 77: 1059-1070.
- Suzuki M, Kirchner JA. Sensory fibers in the recurrent laryngeal nerve. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology* 1969; 78: 21-31.
- Szentàgothai J. Die lokalisation der kehlkopfmuskulatur in deu vaguskernen. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 1943; 112: 704-710.
- Taber E. The cytoarchitecture of the brain stem of the cat I. Brain stem nuclei of the cat. *The journal of comparative neurology* 1961; 116: 27-69.
- Tessema B, Pitman MJ, Roark RM, Berzofsky C, Sharma S, Schaefer SD. Evaluation of functional recovery of recurrente laryngeal nerve using transoral laryngeal bipolar electromyography a rat model. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology* 2008; 117: 604-608.
- Thomander L. Reorganization of the facial motor nucleus after peripheral nerve regeneration. *Acta Oto-laryngologica. Supplementum* 1984; 97: 619-626.
- Uebing A, Uemura H. Thorax: overview and surface anatomy. En: Standring S, editores. *Gray's Anatomy* 40 ed. Londres: Churchill Livingstone; 2008. p. 909-914.
- van Daele DJ, Cassell MD. Multiple forebrain systems converge on motor neurons innervating the thyroarytenoid muscle. *Neuroscience* 2009; 162: 501-524.
- van Gehuchten 1898. Citado por Bieger y Hopkins 1987.
- van Lith-Bijl JT, Mahieu HF. Reinnervation aspects of laryngeal transplantation. *European Archives of Oto-rhino-laryngology* 1998; 255: 515-520.
- Vanderhorst VGJM, Terasawa E, Ralston HJ III. Monosynaptic projections from the nucleus retroambiguus region to laryngeal motoneurons in the rhesus monkey. *Neuroscience* 2001; 107: 117-125.
- Vercelli A., Repici M., Garbossa D., Grimaldi, A. Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Research Bulletin* 2000; 51: 11-28.

- Waldbaum S, Hadziefendic S, Erokwu B, Zaidi SIA, Haxhiu MA. CNS innervation of posterior cricoarytenoid muscles: a transneuronal labelling study. *Respiration Physiology* 2001; 126: 113-125.
- Wallach JH, Rybicki KJ, Kaufman MP. Anatomical localization of the cells of origin of efferent fibers in the superior laryngeal and recurrent laryngeal nerves in dogs. *Brain research* 1983; 261: 307-311.
- Wetzel DM, Kelley DB, Campbell BA. Central control of ultrasonic vocalizations in neonatal rats: I. Brain stem motor nuclei. *Journal of Comparative Physiological Psychology* 1980; 94: 596-605.
- Wilson-Pauwels, Akesson, Stewart, Spacey. Nervios craneales en la salud y en la enfermedad. 2 ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2003.
- Wyke BD, Kirchner JA. Neurology of the larynx. Scientific Foundation of Otolaryngology. Londres: William Heinemann Medical Books; 1976. p. 546-574.
- Yajima Y, Hayashi Y, Yoshii N. Ambiguous motoneurons discharging closely associated with ultrasonic vocalization in rats. *Brain Research* 1982; 238: 445-450.
- Yajima Y, Hayashi Y. Identification of motoneurons in the nucleus ambiguus by antidromic stimulation of the superior and recurrent laryngeal nerves in rats. *Brain Research* 1983; 288: 302-306.
- Yanagisawa M, Ariga T, Yu Rk. Cholera toxin B subunit binding does not correlate with GM1 expression: a study using mouse embryonic neural precursor cells. *Glycobiology* 2006; 16: 19-23.
- Yoshida Y, Miyazaki T, Hirano M, Shin T, Totoki T, Kanaseki T. Location of motoneurons supplying the cricopharyngeal muscle in the cat studied by means of the horseradish peroxidase method. *Neuroscience Letters* 1980; 18: 1-4.
- Yoshida Y, Miyazaki T, Hirano M, Shin T, Totoki T, Kanaseki T. Localization of efferent neurons innervating the pharyngeal constrictor muscles and the cervical esophagus muscle in the cat by means of the horseradish peroxidase method. *Neuroscience Letters* 1981; 22: 91-95.
- Yoshida Y, Miyazaki T, Hirano M, Shin T, Kanaseki T. Arrangement of motoneurons innervating the intrinsic laryngeal muscles of cats as demonstrated by horseradish peroxidase. *Acta Oto-laryngologica* 1982; 94: 329-334.
- Yoshida Y, Mitsumasu T, Miyazaki T, Hirano M, Kanaseki T. Distribution of motoneurons in the brain stem of monkeys, innervating the larynx. *Brain research bulletin* 1984; 13: 413-419.

- Yoshida Y, Mitsumasu T, Hirano M, Kanaseki T. Somatotopic representación of the laryngeal motoneurons in the medulla of monkeys. *Acta Oto-laryngologica. Supplementum* 1985; 100: 299-303.
- Yoshida Y, Tanaka Y, Mitsumasu T, Hirano M, Kanaseki T. Central location of the laryngeal efferent neurons in the nucleus ambiguus of monkeys. En: Hirano M, Kirchner JA, Bless DM, editores. *Neurolaryngology recent advances*. Boston: Collage-Hill Press; 1987. p. 2-18.
- Yoshida Y, Yatake K, Tanaka Y, Imamura R, Fukunaga H, Nakashima T, Hirano M. Morphological observation of laryngeal motoneurons by means of cholera toxin B subunit tracing technique. *Acta Oto-laryngologica. Supplementum* 1998; 539: 98-105.
- Zemlin WR. *Speech and hearing science. Anatomy and physiology*. Boston: Allyn and Bacon; 1998.



